

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre 626

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(SPÉCIALITÉ : SCIENCE DES ALIMENTS)

Soutenue le 19 Décembre 2013

AUORE VILLAY

**Production en photobioréacteurs et caractérisation structurale
d'un exopolysaccharide produit par une microalgue rouge :
Rhodella violacea. Application à l'obtention d'actifs
antiparasitaires.**

Président :	Pr Y. BLACHE, Professeur à l'Université de Toulon
Rapporteurs :	Pr D. LECERF, Professeur à l'Université de Rouen Dr E. PETIT, MCF HDR à l'Université de Picardie-Jules Verne
Examineur :	Dr H. EL ALAOUI, MCF HDR à l'Université Blaise Pascal
Co-directrice de thèse :	Dr C. LAROCHE, MCF HDR à l'Université Blaise Pascal
Co-directeur de thèse :	Pr P. MICHAUD, Professeur à l'Université Blaise Pascal

Institut Pascal
Axe Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes

Résumé

Les microalgues rouges de l'espèce *Rhodella violacea* produisent un exopolysaccharide soluble dans le milieu de culture. Au cours de ce travail, les conditions optimales de production ont été déterminées en étudiant l'activité photosynthétique et le milieu de culture des microalgues. La croissance cellulaire et la production d'EPS de *R. violacea* sont optimales avec un milieu de culture f/2 modifié, supplémenté en azote et en phosphore. L'irradiance optimale est de 420 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sous une température de 24°C avec un pH de 8,3. La culture de la microalgue en photobioréacteur de 5 L a permis la production optimale de 0,5 g.L^{-1} de polymère. Le polysaccharide produit est un protéoglycane de type xylane sulfaté et de haute masse molaire ($1,2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$), contenant également du rhamnose, du glucose, de l'arabinose, du galactose et de l'acide glucuronique. L'effet antiparasitaire des polymères de microalgues et de macroalgues a été testé sur des microsporidies, *in vitro* avec des fibroblastes de prépuce humain infestés par *Encephalitozoon cuniculi* et *in vivo* contre la nosérose des abeilles causée par *Nosema ceranae*. L'exopolymère de *R. violacea* empêche la croissance des microsporidies *in vitro* et *in vivo*, et conduit à une diminution de la mortalité des abeilles. D'autres molécules testées ont également une action antiparasitaire, les EPS de *Porphyridium purpureum* et *marinum*, et des carraghénanes sulfatés permettent également de diminuer la croissance des microsporidies et la mortalité des abeilles.

Mots clefs : *Rhodella violacea*, exopolysaccharide, culture de microalgues, microsporidies, nosérose.

Abstract

Red microalgae from *Rhodella violacea* species product a soluble exopolysaccharide release in the media. In this study, optimal culture conditions for exopolysaccharide production were investigated, following photosynthesis activity and culture conditions. This study allowed us to determinate *R. violacea* optimal media for growth and exopolysaccharide production, which is f/2 media supplemented in nitrogen and phosphorus. Optimal physicochemical parameters are an irradiance of 420 μmol photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a temperature of 24°C, and a pH of 8.3. Photobioreactor of 5 L used to cultivate *R. violacea* in optimal conditions, gave 0.5 g.L^{-1} of EPS. Structural analysis of the EPS revealed the production of a proteoglycan, principally composed by xylose, sulfated and with a high molecular mass ($1.2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$). The polymer is complex, as it contains different monosaccharide: rhamnose, galactose, arabinose and glucuronic acid. The antiparasitic effect of polymers from microalgae, and macroalgae were investigated on microsporidia, *in vitro* against *Encephalitozoon cuniculi* using Human foreskin fibroblasts, and *in vivo* against *Nosema ceranae* using bees. Exopolysaccharide from *R. violacea* decreases microsporidia growth *in vivo* and *in vitro*. In addition, *in vivo* the polymer allows decrease in bees' mortality. Polysaccharide from others origins also have antiparasitic effet, such as exopolymer from *Porphyridium purpureum* and *marinum*, and sulphated carragheenans which reduce microsporidia growth, and decrease bees' mortality.

Keywords : *Rhodella violacea*, exopolysaccharide, microalgae culture, microsporidia, nosema.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'AUVERGNE

ANNEE 2013

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

(Spécialité : Sciences des Aliments)

Aurore Villay

Production en photobioréacteurs et caractérisation structurale d'un
exopolysaccharide produit par une microalgue rouge : *Rhodella*
violacea. Application à l'obtention d'actifs antiparasitaires.

Président :	Pr Y. BLACHE, Professeur à l'Université de Toulon
Rapporteurs :	Pr D. LECERF, Professeur à l'Université de Rouen Dr E. PETIT, MCF HDR à l'Université de Picardie-Jules Verne
Examineur :	Dr H. EL ALAOU, MCF HDR à l'Université Blaise Pascal
Co-directrice de thèse :	Dr C. LAROCHE, MCF HDR à l'Université Blaise Pascal
Co-directeur de thèse :	Pr P. MICHAUD, Professeur à l'Université Blaise Pascal

Remerciements

La reconnaissance est la mémoire du cœur.

(Hans Christian Andersen)

Je remercie le Pr Michel DHOME directeur de l'Institut Pascal et le Pr Claude-Gilles DUSSAP responsable de l'axe GePEB pour m'avoir accueillie au sein de leur établissement.

J'adresse mes remerciements à mes directeurs de thèse, le Pr Philippe MICHAUD et le Dr Céline LAROCHE, pour leur encadrement de qualité.

Je remercie le Pr Didier LECERF et le Dr Emmanuel PETIT d'avoir accepté d'examiner mon travail, ainsi que le Pr Yves BLACHE qui a accepté de présider ma soutenance de thèse.

Dans le cadre de mon travail en collaboration avec le Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, je remercie le Pr Frédéric DELBAC pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je remercie le Dr Hicham EL ALAOUI pour son encadrement, et son aide précieuse. Je remercie Mickaël, Marie, Anne Catherine et Diane, pour leurs implications, ainsi que toutes les personnes du LMGE qui ont donné de leur temps en participant aux expérimentations sur les abeilles et tout particulièrement Régis et Julie qui m'ont aidé à rattraper les abeilles.

Je remercie Christophe RIHOUEY du laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces de l'Université de Rouen.

Je remercie toutes les personnes de l'Institut Pascal qui m'ont aidé dans mon travail.

Jean-François CORNET, Guillaume PIERRE, Christophe VIAL, Fabrice GROS et Cédric DELATTRE pour leurs explications et leurs conseils.

Je remercie Christine pour son aide. Je remercie toutes les personnes de mon environnement de travail pour leurs conseils et tous les bons moments passés ensemble.

Enfin je remercie toutes les personnes impliquées de près ou de loin dans mon travail, pour leur aide et leur soutien.

Table des Matières

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique	4
1. Généralités sur les algues	4
1.1. Classification des macro- et microalgues	5
1.1. Les différents embranchements ou classes de microalgues	13
1.1.1. Taxonomie des microalgues rouges	13
1.1.2. Les microalgues marines rouges du genre <i>Rhodella</i>	15
1.1.2.1. Classification des <i>Rhodella</i>	15
1.1.2.2. Caractérisation structurale des <i>Rhodella</i>	16
1.2. Photosynthèse et microalgues	17
1.2.1. Généralités	17
1.2.2. La photosynthèse chez les microalgues marines rouges	24
1.3. Culture des microalgues	25
1.3.1. Effets de la composition du milieu sur la croissance des microalgues	26
1.3.1.1. Le substrat carboné	26
1.3.1.2. Le substrat azoté	29
1.3.1.3. Le phosphore et le soufre	31
1.3.1.4. Les sels et les microéléments	32
1.3.2. Effets des conditions d'irradiance et de l'environnement physico-chimique	34
1.3.2.1. L'irradiance	34
1.3.2.2. Température et pH	37
1.3.3. Conditions de culture des microalgues marines rouges	38

1.4. Molécules d'intérêts produites par les microalgues	42
1.4.1. Les lipides	42
1.4.2. Les protéines	44
1.4.3. Les pigments et les antioxydants	44
1.4.4. Les polysaccharides	47
1.4.4.1. Généralités.....	47
1.4.4.2. Les polysaccharides de microalgues	48
2. La nosémose des abeilles	53
2.1. Les microsporidies	53
2.2. Les abeilles	54
2.3. Impact de la nosémose sur l'apiculture	55
2.4. Microsporidies et abeilles – Le mécanisme de l'infection	57
2.4.1. La nosémose chez les abeilles.....	57
2.4.2. Cycle des microsporidies	58
2.4.2.1. La phase infectieuse	58
2.4.2.2. La phase de prolifération.....	59
2.4.2.3. La sporogonie	59
2.4.3. Le mécanisme de l'infection	59
2.5. Traitements de la nosémose	61

Chapitre II : Matériels et Méthodes..... 66

1. Microalgues	66
1.1. Souches.....	66
1.2. Milieux et conditions de culture.....	66
1.3. Conditions de culture testées pour les souches de l'espèce <i>R. violacea</i> LMGEIP 001	72
1.4. Mesure de l'activité photosynthétique	72

1.5. Quantification de la biomasse	75
1.5.1. Comptage sur cellule de Malassez	75
1.5.2. Masse sèche.....	75
1.6. Culture des microalgues	75
1.6.1. Culture en Erlenmeyers.....	75
1.6.2. Culture en photobioréacteurs	76
1.6.2.1. Photobioréacteur de 600 mL	76
1.6.2.2. Photobioréacteur de 5 L	76
1.7. Techniques de Biologie Moléculaire.....	77
1.7.1. Extraction de l'ADN.....	77
1.7.2. Techniques d'amplification de l'ADN.....	78
1.7.3. Séquençage de l'ADN	79
1.7.4. Analyse et comparaison de séquences	79
2. Les techniques d'analyse.....	80
2.1. Extraction des exopolysaccharides.....	80
2.1.1. Polysaccharides de microalgues.....	80
2.1.2. Polysaccharides de macroalgues	80
2.2. Dosages colorimétriques.....	81
2.2.1. Dosage des nitrates.....	81
2.2.2. Dosage des protéines.....	82
2.2.2.1. Méthode de Bradford.....	82
2.2.2.2. Méthode de Lowry	83
2.2.3. Dosage des acides uroniques et des oses neutres	84
2.2.3.1. Dosage des oses neutres	84
2.2.3.2. Dosage des oses acides.....	84
2.2.3.3. Correction des interférences des oses neutres/osés acides.	85

2.2.4.	Dosage des oses totaux par la méthode de Dubois	86
2.2.5.	Dosage des sulfates	86
2.3.	Caractérisation structurale des exopolysaccharides.....	87
2.3.1.	Désulfatation des exopolysaccharides	87
2.3.2.	Composition en monosaccharides des polysaccharides.....	87
2.3.2.1.	Identification des monosaccharides par chromatographie ionique	87
2.3.2.2.	Identification des monosaccharides par Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM).....	89
2.3.3.	Analyse des liaisons glycosidiques par Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM).....	95
2.3.3.1.	Préparation du réactif solide NaOH/DMSO.....	97
2.3.3.2.	Méthylation du polysaccharide	97
2.3.3.3.	Formation des AAPM	97
2.3.4.	Analyse infrarouge	98
2.3.5.	Propriétés physico-chimiques des polysaccharides	99
2.3.5.1.	Etude rhéologique.....	99
2.3.5.2.	Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles (CES-DLLMA)	102
3.	Mesure des activités antiparasitaires des polysaccharides	104
3.1.	Test des activités antiparasitaires.....	104
3.1.1.	Tests <i>in vitro</i> sur le modèle HFF – <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	104
3.1.2.	Test <i>in vivo</i> en cagettes sur le modèle abeille – <i>Nosema ceranae</i>	106
3.1.2.1.	Préparation des abeilles	106
3.1.2.2.	Infection individuelle	107
3.1.2.3.	Suivi des abeilles et de l'infection.....	107

Chapitre III : Résultats et Discussion 108

1. Identification de la microalgue <i>R. violacea</i> LMGEIP 001	108
2. Mode de culture des microalgues.....	110
2.1. Cultures en autotrophie	111
2.2. Cultures en mixotrophie et hétérotrophie	113
3. Optimisation de la production de biomasse par <i>Rhodella violacea</i>.....	114
3.1. Analyse stœchiométrique du milieu de culture	114
3.2. Optimisation de l'activité photosynthétique.....	116
3.2.1. Effet de l'irradiance	116
3.2.2. Effet de la température	117
3.2.3. Effet du pH.....	118
3.3. Culture en photobioréacteurs	119
3.3.1. Cultures en photobioréacteur de 600 mL.....	120
3.3.2. Culture en photobioréacteur de 5 L.....	123
3.4. Conclusion intermédiaire	124
4. Caractérisations structurale et physico-chimique du polysaccharide de <i>Rhodella violacea</i> LMGEIP 001	125
4.1. Caractérisation chimique	125
4.1.1. Dosages colorimétriques	125
4.1.2. Composition monosaccharidique	126
4.1.2.1. Identification des monosaccharides par chromatographie ionique	127
4.1.2.2. Identification des monosaccharides par Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	129
4.1.3. Analyse Infrarouge.....	135
4.1.3.1. Analyse infrarouge du polysaccharide natif.....	135
4.1.3.2. Analyse Infrarouge du polysaccharide désulfaté.....	138

4.2. Propriétés physico-chimiques du polysaccharide	138
4.2.1. Analyse en CES-DLLMA	138
4.2.2. Analyse rhéologique	142
4.3. Conclusion intermédiaire	144
5. Activités antiparasitaires des polysaccharides de micro- et macroalgues contre les microsporidies.....	145
5.1. Etude de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i> sur des cellules fibroblastiques de prépuce humain (HFF) (microsporidies <i>Encephalitozoon cuniculi</i>).....	146
5.2. Etude de l'activité antiparasitaire <i>in vivo</i> sur le modèle abeille (microsporidie <i>Nosema ceranae</i>).....	148
5.3. Conclusion intermédiaire	154
Conclusion.....	155
Références	158

Table des figures

Figure 1 Ultrastructure de microalgues (Pignolet <i>et al.</i> , 2013). Cellules de microalgues : verte (a) rouge (b) et cyanobactérie (c).	6
Figure 2 Taxonomie de l'espèce <i>R. violacea</i> (Cavalier-Smith, 1998 ; Yoon <i>et al.</i> , 2006).	15
Figure 3 Ultrastructure de <i>Rhodella violacea</i> sous microscope électronique à transmission (Scott <i>et al.</i> , 2011).	17
Figure 4 Structure du chloroplaste.	18
Figure 5 Structure des chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> [2].	19
Figure 6 Structure des chlorophylles <i>c</i> ₁ et <i>c</i> ₂ (Mizoguchi <i>et al.</i> , 2011).	20
Figure 7 Structure des chlorophylles <i>a</i> , <i>a'</i> , <i>d</i> et <i>d'</i> (Fukusumi <i>et al.</i> , 2012).	20
Figure 8 Spectres d'absorption des principaux pigments photosynthétiques (Voet et Voet, 2005).	21
Figure 9 Structure de la phycoérythrine (Wiethaus <i>et al.</i> , 2010).	22
Figure 10 Mécanisme de la photosynthèse (Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings)	22
Figure 11 Cycle de Calvin [3]	23
Figure 12 Photosystème de <i>Prochlorococcus marinus</i> (Wiethaus <i>et al.</i> , 2010). PE : phycoérythrine ; PC : phycocyanine ; AP : allophycocyanine ; D1 et D2 : protéines liées aux chlorophylles ; cyt : cytochrome.	25
Figure 13 Courbe de croissance des microalgues	26
Figure 14 Respiration et photosynthèse chez les végétaux en fonction de l'irradiance (Tousignant et Delorme, 2006).	34
Figure 15 Etang en raceway Sandia National Laboratories USA (Photo courtesy RFE. Renewable Fuel &Energy B.V.)	40
Figure 16 Schéma d'un étang ouvert en raceway (champs de course) utilisé pour la culture de microalgues (Lam et Lee, 2011).	41
Figure 17 Transfert de rayonnement au sein de photobioréacteurs (image Jérémy Pruvost GEPEA).	42
Figure 18 Structure des principaux caroténoïdes de microalgues (Guaratini <i>et al.</i> , 2009)	45
Figure 19 Structure du Coenzyme Q10	46
Figure 20 Structure de l'alpha-tocophérol	46

Figure 21 Structure de la cellulose (Heinze et Liebert, 2001)	48
Figure 22 Structures de l'amylose et de l'amylopectine [4].	49
Figure 23 Structure de deux fractions oligosaccharidiques du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium sp.</i> (Gloagen <i>et al.</i> , 2004).....	51
Figure 24 Schéma et image en microscopie électronique à transmission d'une spore. A gauche image de palaeos.com/Eukarya. A droite <i>Fibrillanosema crangonycis</i> [5].....	53
Figure 25 Les différentes classes d'abeilles et leur morphologie [6].....	54
Figure 26 Larve de reine d'abeille dans sa gelée royale [6].....	55
Figure 27 Processus de germination des microsporidies : mécanisme d'extrusion du tube polaire (Keeling et Fast, 2002).....	59
Figure 28 Schéma bilan du cycle des microsporidies (Desportes-Livage et Datry, 2005). Développement d' <i>Encephalitozoon intestinalis</i> dans les cellules intestinales.....	60
Figure 29 Adhésion de la spore <i>Encephalitozoon intestinalis</i> à une cellule de l'épithélium colorectal humain. Image d' <i>Encephalitozoon intestinalis</i> , obtenue au microscope à transmission électronique (Hayman <i>et al.</i> , 2005).....	60
Figure 30 Infection des cellules de l'intestin d'abeilles <i>Apis mellifera</i> par <i>Nosema ceranae</i> . Infestation à 3 et 6 jours. Coloration au bleu de Méthylène (Higes <i>et al.</i> , 2007).	61
Figure 31 Fumagilline.	62
Figure 32 Sulfonamides et Sulfadiméthoxine.	63
Figure 33 Triméthoprime.	63
Figure 34 5-nitroimidazole.....	63
Figure 35 Structure des Glycosaminoglycanes, exemple de cinq molécules.....	64
Figure 36 Electrode de Clark	73
Figure 37 Chambre DW2/2 et unité de contrôle	73
Figure 38 Photobioréacteur et périphériques de régulation.	76
Figure 39 Séquence de l'ADN du gène codant pour l'ARN pré-ribosomique 45S.	77
Figure 40 Gradient d'élution des monosaccharides en CEAHP.	88
Figure 41 Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides, d'après BeMiller (1967).....	90
Figure 42 Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell <i>et al.</i> , (1965). .	91
Figure 43 Triméthylsilylation des <i>O</i> -méthylglycosides d'après Kamerling <i>et al.</i> , (1975).	91
Figure 44 Formation d'acétates d'alditol (Urbani <i>et al.</i> , 2012).	93
Figure 45 Greffage diméthylpolysiloxane composant la colonne capillaire HP-1 (30 m, 0,320 mm, 0,25 µm) utilisée pour les analyses en CPG/SM.....	93

Figure 46 Formation des AAPM, d'après Garon-Lardière (2004).....	96
Figure 47 Ordre de clivage préférentiel au sein des AAPM, d'après Garon-Lardière (2004).	96
Figure 48 Comportements rhéologiques de liquides aux propriétés physiques différentes.	100
Figure 49 Etat d'enchevêtrement des polymères en fonction de la concentration.....	102
Figure 50 Structure du MUP.	106
Figure 51 Abeilles naissantes [6]	106
Figure 52 Cage�tte contenant les abeilles [7]	106
Figure 53 Migration du fragment d'ADN codant pour l'ARNr 18S de <i>Rhodella violacea</i> avec une échelle de poids moléculaire (Hyperladder I).	108
Figure 54 Séquence d'ADN codant pour l'ARNr 18S de <i>R. violacea</i>	109
Figure 55 Arbre phylogénétique déduit de la comparaison des séquences des gènes codant pour les ARNr 18S de microalgues rouges: <i>Cyanidium caldarium</i> , et d'espèces appartenant aux genres <i>Rhodella</i> et <i>Porphyridium</i>	110
Figure 56 Croissance cellulaire de <i>Rhodella violacea</i> LMGEIP 001 en Erlenmeyer, avec différents milieux de culture et ajout de bicarbonate (20 mM).	111
Figure 57 Effet de l'irradiance sur la photosynthèse de <i>Rhodella violacea</i>	116
Figure 58 Effet de la température sur la photosynthèse de <i>Rhodella violacea</i>	118
Figure 59 Effet du pH sur la photosynthèse de <i>Rhodella violacea</i>	119
Figure 60 Photobioréacteurs de 600 mL	120
Figure 61 Croissance (-●- cellules.mL ⁻¹), consommation de nitrate (-▲- mg.L ⁻¹) et production d'oses extracellulaires (-■- mg.L ⁻¹) par <i>Rhodella violacea</i> LMGEIP 001 dans les photobioréacteurs PA (A), PB (B) et PC (C).	121
Figure 62 Croissance (-●- cellules.mL ⁻¹), consommation en nitrate (-▲- mg.L ⁻¹) et production d'oses extracellulaires (-■- mg.L ⁻¹) par <i>Rhodella violacea</i> dans le photobioréacteur de 5 L PC' (milieu f/2 modifié).	123
Figure 63 Exopolysaccharide de <i>Rhodella violacea</i> produit en photobioréacteur de 5 L.....	125
Figure 64 Composition des hydrolysats de l'EPS de <i>Rhodella violacea</i> analysés en CEAHP. Hydrolysats obtenus avec de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'acide sulfurique (H ₂ SO ₄). ...	127
Figure 65 Composition en monosaccharides de <i>R. violacea</i> LMGEIP 001 déterminée par CPG/SM (70 eV) après hydrolyse et traitement au BSTFA-TMCS.	130
Figure 66 Voies de fragmentation de dérivés O-trim�thylsilylglycosides par CPG/SM en Impact Electronique (EI, 70 eV).	131

Figure 67 Composition en monosaccharides de <i>R. violacea</i> LMGEIP 001 déterminée par CPG/SM-IE (70 eV) après hydrolyse et formation d'acétates d'alditols.....	132
Figure 68 Voies de fragmentation d'acétates d'alditols par CGP/SM en Impact Electronique (EI, 70 eV).....	133
Figure 69 Profils chromatographiques obtenus en CPG/SM-IE (70 eV) des compositions en liaisons glycosidiques (A) d'un xylane commercial, (B) de l'EPS de <i>R. violacea</i> LMGEIP 001 et (C) d'un arabinoxylane commercial.....	135
Figure 70 Spectres Infrarouge des exopolymères de <i>Rhodella violacea</i> LMGEIP 001 natif.	136
Figure 71 Spectre Infrarouge de l'exopolymère de <i>Rhodella violacea</i> LMGEIP 001 natif entre 1 800 et 800 cm ⁻¹	136
Figure 72 Comparaison des spectres de l'exopolymère de <i>R. violacea</i> natif (rouge) et après désulfatation (bleu).....	138
Figure 73 Chromatogrammes d'exclusion stérique haute pression (détection dRI) obtenus à partir des solutions A, B, C et D.	140
Figure 74 Profil des masses molaire de l'EPS de <i>R. violacea</i> de l'échantillon D en sortie de CES-DLLMA.	140
Figure 75 Chromatogramme de l'EPS de <i>R. violacea</i> (échantillon D) élué en sortie de CES-DLLMA.....	141
Figure 76 Comportement rhéologique de l'EPS de <i>R. violacea</i> à différentes concentrations (0,5 g.L ⁻¹ à 4 g.L ⁻¹ , en solution dans l'eau à 20°C).	143
Figure 77 Comportement rhéologique de l'EPS de <i>R. violacea</i> à 3,5 g.L ⁻¹	143
Figure 78 Viscosité spécifique de l'EPS de <i>R. violacea</i> en fonction de la concentration, pour la détermination de la concentration critique de recouvrement C*.....	144
Figure 79 Multiplication des microsporidies <i>Encephalitozoon cuniculi</i> dans les cellules HFF en présence d'extraits polysaccharidiques à différentes concentrations.	146
Figure 80 Multiplication des microsporidies <i>Encephalitozoon cuniculi</i> dans les cellules HFF en présence d'extrait polysaccharidique.	147
Figure 81 Consommation de saccharose par les abeilles infectées par les microsporidies <i>Nosema ceranae</i>	151
Figure 82 Mortalité des abeilles infectées par les microsporidies <i>Nosema ceranae</i>	151
Figure 83 Mortalité (rouge) et charge parasitaire (bleu) des abeilles infectées par les microsporidies <i>Nosema ceranae</i>	153

Table des tableaux

Tableau 1 Classification des cyanobactéries (Kornprobst, 2005).....	8
Tableau 2 Classification des algues vertes (De Reviers 2003).	8
Tableau 3 Classification des algues rouges marines (Silva et Moe, 1997).	11
Tableau 4 Classification de l'embranchement des Dinophyta	13
Tableau 5 Classification des Ochrophyta.....	14
Tableau 6 Gradient utilisé en CEAHP pour l'analyse des monosaccharides neutres et acides	88
Tableau 7 Gradients de température utilisés en CPG.....	94
Tableau 8 Croissance cellulaire, en fin de cultures et productivité en sucres extracellulaires pour les différents milieux testés.....	113
Tableau 9 Croissance cellulaire et production de polysaccharides par <i>Rhodella violacea</i> cultivée dans les photobioréacteurs PA, PB, PC et PC'.....	124
Tableau 10 Composition globale des polysaccharides extracellulaires de <i>Rhodella violacea</i> (% massique) produits sous différentes conditions de culture en photobioréacteur (PA, PB, PC et PC').	126
Tableau 11 Caractérisation par CEAHP des exopolysaccharides produits par <i>Rhodella violacea</i> LMGEIP 001 extraits des milieux de culture des photobioréacteurs PA, PB, PC et PC'.....	128
Tableau 12 Composition en monosaccharides de l'exopolysaccharide extrait du milieu de culture de photobioréacteur PC' produit par <i>Rhodella violacea</i> (% massique).	132
Tableau 13 Distribution des masses des molécules constitutives de l'EPS élué en chromatographie CES-DLLMA.....	142
Tableau 14 Caractéristiques des polymères testés	149

Abréviations

AA : Acétates d'alditols

AAPM : Acétates d'alditols partiellement méthyles

Ac : Acide

A.P.H.A : *American Public Health Association*

ATF : Acide trifluoroacétique

BSTFA : *N,O*-bis-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide

C* : Concentration critique de recouvrement

CCAP : Banque de microalgues : *Culture Collection of Algae and Protozoa*

CEAHP : Chromatographie échangeuse d'anions haute performance

CES-DLLMA : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles

CPG/SM : Chromatographie phase gazeuse - spectromètre de masse

CR : Centres réactionnels

dn/dc : Incrément d'indice de réfraction

DO : Densité optique

dRI : Differential index of refraction

EMA : Eau de mer artificielle

EPS : Exopolysaccharide

HFF : Human foreskin fibroblasts (cellules fibroblastiques de prépuce humain)

GAG : Glycosaminoglycanes

G : Irradiance

G_c : Irradiance au point de compensation

G_{max} : Irradiance maximale, qui entraîne un stress cellulaire

G_{min} : Irradiance minimale, qui limite la croissance des cellules

G_s : Irradiance de saturation

IE : Impact électronique

Ip : Indice de polydispersité

MEM : Minimum essential medium

M_n : Masse molaire moyenne en nombre

M_w : Masse molaire moyenne en poids

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

PA : Photobioréacteur A : 600 mL, milieu f/2 standard, 150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

PB : Photobioréacteur B : 600 mL, milieu f/2 supplémenté, 150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

PBR : Photobioréacteur

PC : Photobioréacteur C : 600 mL, milieu f/2 supplémenté, 4200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

PC' : Photobioréacteur C' : 5 L. Culture dans le milieu f/2 standard,

PS I et II : Photosystèmes I et II

QSP : Quantité suffisante pour

Rg : Rayon de giration

Rh : Rayon hydrodynamique

RuBP : Ribulose 1-5 biphosphate

RuBisCO : Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase

TIC : Total ion chromatogram

TMCS : Triméthylchlorosilane

TMS : Triméthylsilylés

UV : Ultra violet

Introduction

Les algues sont des organismes photosynthétiques d'une grande diversité qui regroupent de nombreuses espèces (entre 300 000 et 1 million). Les algues représentent une part importante de la biomasse végétale de la terre et sont utilisées depuis des millénaires dans les alimentations humaine et animale, comme combustible, ou encore comme engrais. Les algues sont capables de se développer dans une large gamme de conditions, grâce à leur étonnant système d'adaptation ainsi que leur variabilité. De ce fait, on les retrouve dans tous les environnements humides depuis les milieux marins et les eaux douces de surface jusqu'aux milieux extrêmes tels que les milieux acides (algues acidophiles), les milieux fortement salés (algues halophiles) ou encore les eaux profondes jusqu'à 250 m (algues rouges).

Parmi les algues, les microalgues présentent un intérêt grandissant dans de nombreux domaines. En effet, du fait de l'augmentation du taux de CO₂ atmosphérique, les microalgues apparaissent comme une solution d'avenir, pour leur capacité à fixer le CO₂ (puits de carbone) et également dans le domaine de la bioconversion des eaux usées. De plus, les microalgues sont des organismes producteurs de nombreuses molécules pouvant présenter un intérêt en termes de valorisation. Elles produisent des glucides, des lipides, des pigments et des protéines complexes dont les propriétés biologiques et physico-chimiques sont valorisables en industrie alimentaire, en cosmétique, dans les domaines médicaux et pharmacologiques. Les microalgues peuvent également produire de l'hydrogène, du méthane et des hydrocarbures de nature lipidique. Dans un contexte de diminution des stocks d'énergies fossiles, la production de biocarburants par ces microorganismes suscite donc un intérêt croissant et de nombreuses investigations, notamment pour le développement d'une bioraffinerie dédiée à la production de biocarburant de troisième génération. En effet la culture de ces organismes ne rentre pas en compétition avec les plantes terrestres dédiées à l'alimentation humaine pour l'occupation de terres arables et semble donc une alternative à haut potentiel par rapport aux biocarburants de première et seconde générations.

Les microalgues les plus étudiées aujourd'hui, notamment pour la production de biocarburants, sont les microalgues vertes (*Chlorella*, *Chlamydomonas*,...), la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et des microalgues qualifiées d'oléagineuses telles que *Botryococcus braunii*, *Dunaliella* sp., ou *Nannochloropsis* sp. Parallèlement à ces travaux, des

Introduction

investigations croissantes sur le bioraffinage des microalgues rouges et notamment celles appartenant au genre *Porphyridium* sont menées pour la production de biomolécules. La littérature contient également beaucoup de données sur le système de photosynthèse spécifique des microalgues rouges et des cyanobactéries, le phycobilisomes, qui est un système supplémentaire de collecte des photons, responsable de leur adaptation aux eaux profondes. De façon surprenante, la plupart des études se limitent aux microalgues rouges appartenant au genre *Porphyridium* et les produits issus d'autres microalgues rouges telles que celles appartenant au genre *Rhodella* ne sont que faiblement documentés. Il existe donc peu de données sur l'optimisation des cultures de ce genre de microalgue, et sur la caractérisation des biomolécules qu'elles produisent.

L'objectif initial de ce travail de thèse était la caractérisation structurale de l'exopolymère produit par une microalgue rouge appartenant à l'espèce *Rhodella violacea* et la mise en évidence de la possibilité d'utiliser ce biopolymère comme antiparasitaire. Les activités biologiques des polysaccharides ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE) de l'Université Blaise Pascal. Les travaux réalisés au LMGE visaient à tester l'effet antiparasitaire de polysaccharides sur le modèle microsporidies *in vitro* et *in vivo*. En effet, de nombreux polysaccharides et notamment les polysaccharides sulfatés d'algues, peuvent présenter des activités biologiques. Les microsporidies infectent les cellules hôte via le système de communication cellulaire en se fixant sur les glycosaminoglycanes de surface. Les glycosaminoglycanes sont des hétéropolysaccharides complexes et sulfatés et certains d'entre eux peuvent présenter des activités de type mimétique des GAGs. Ils peuvent par conséquent entrer en compétition avec les sites d'adhésion du parasite au niveau de la cellule hôte.

Pour atteindre les différents objectifs de ce travail, la croissance et la production de l'exopolysaccharide (EPS) de la microalgue ont été optimisées avec différents types de photobioréacteurs par le biais d'études stœchiométriques des milieux de culture et par la détermination des meilleurs paramètres de culture pour une activité photosynthétique maximale. Ce manuscrit s'articule autour de trois parties :

Tout d'abord la synthèse bibliographique présente l'état de l'art concernant les algues et plus précisément les microalgues. La classification des algues, les principaux produits issus de ces organismes, ainsi que les méthodes de culture sont présentées.

Introduction

Ensuite le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail de thèse sont décrits. Dans ce chapitre, les différents milieux de culture testés, les méthodes d'optimisation de la culture et de la production de l'exopolysaccharide, les protocoles d'analyse du polymère et le déroulement des tests antiparasitaires, sont détaillés et explicités.

Enfin les résultats obtenus sont présentés et discutés dans une dernière partie. Les conditions optimales de cultures y sont décrites et les résultats de la caractérisation de l'exopolysaccharide de *Rhodella violacea* sont commentés. Enfin, les résultats des tests d'activités antiparasitaires de l'EPS de *Rhodella violacea* ainsi que celui d'autres polysaccharides (EPS de *Porphyridium*, EPS de macroalgues et carraghénanes) sont exposés.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur les algues

Les algues, tout comme les plantes terrestres, sont des organismes photoautotrophes chlorophylliens. Grâce à la photosynthèse, elles sont capables de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique et utilisent le dioxyde de carbone (CO_2) pour la formation d'hydrates de carbone indispensables à la vie. Les hydrates de carbone synthétisés sont la forme de stockage de l'énergie et sont à la base de l'architecture des cellules.

Selon Prescott (2003), la majorité des algues vivent en milieu aquatique et la plupart sont des algues d'eau douce. Les algues se différencient des autres végétaux par leur structure en thalle et leur absence de racines, de tiges et de feuilles. Le thalle est un appareil végétatif dont la structure varie avec l'espèce. Il peut être unicellulaire, filamenteux, lamellaire, tubulaire ou colonial. Les algues existent sous la forme d'organismes pluricellulaires, qualifiés de macroalgues et sous la forme d'organismes unicellulaires plus connus sous le nom de microalgues. Les algues peuvent se reproduire de façon sexuée grâce à la production de gamètes. Cependant, elles se multiplient principalement par reproduction asexuée selon trois mécanismes. Deux d'entre eux sont spécifiques des algues pluricellulaires. Il s'agit de la fragmentation, où des cellules se détachent de l'algue mère pour constituer un nouvel individu identique à l'algue d'origine, et la production de cellules spécialisées fertiles, les sporocystes à l'origine de la formation de spores. Le troisième mécanisme, la scission binaire au cours de laquelle une cellule se divise pour former deux nouvelles cellules, est utilisée par les algues unicellulaires.

Les algues ont un rôle important au niveau de l'atmosphère de la planète car elles sont responsables de plus de 50% du renouvellement de l'oxygène. Elles sont d'une grande diversité puisqu'elles comprennent entre 300 000 et 1 million d'espèces (Ifremer).

Les microalgues (du grec μικρός, mikrós, qui signifie petit et du latin alga pour algue) sont des organismes unicellulaires aquatiques et photosynthétiques dont la taille varie du micron à la centaine de microns. Les cellules sont délimitées par une membrane plasmique le plus souvent associée à une paroi polysaccharidique. Elles contiennent dans leur cytoplasme de nombreux organites nécessaires à leur fonctionnement et à leur métabolisme. Les compositions intracellulaire et membranaire des microalgues varient avec le type de

Synthèse bibliographique

microalgue. Cependant, il existe des caractéristiques communes entre les grands groupes de microalgues.

Une grande majorité des espèces de microalgues possède un ou plusieurs flagelles. Les microalgues eucaryotes possèdent un noyau généralement excentré et un pyrénoïde (parfois deux) disposé au centre du chloroplaste. Les cellules possèdent des molécules de réserve carbonée, principalement extraplastidiales, présentes dans le cytosol sous forme de grains de glucanes, ou de gouttelettes lipidiques. Dans le cytoplasme, il y a également des vacuoles et les mitochondries ont la plupart du temps des crêtes aplaties. La Figure 1 correspond aux principales microalgues étudiées dans la littérature, qui appartiennent aux embranchements Rhodophytes, Chlorophytes et Cyanophytes.

1.1. Classification des macro- et microalgues

Les algues forment un groupe polyphylétique d'organismes puisqu'elles n'ont pas toutes un ancêtre commun direct et sont apparues à des périodes différentes. Par conséquent, on retrouve des algues dans différents règnes (plantes, bactéries ...). De plus, le terme « algue » n'entre pas dans la classification des organismes vivants et il n'est pas considéré comme un taxon. Cependant, les algues représentent un ensemble d'organismes aux caractéristiques communes qui peuvent être définies (hors classification). L'étude des algues s'appelle la phycologie. Les algues sont des organismes photosynthétiques des zones aquatiques (ou humides), thallophytes et possédant de la chlorophylle *a*. La plupart des algues sont eucaryotes. Cependant, certains organismes procaryotes possédant de la chlorophylle tels que les cyanobactéries et les prochlorophytes (*Prochloron*, *Prochlorococcus*) sont qualifiés d'algues.

La classification des êtres vivants est en constant remaniement du fait de l'amélioration des techniques d'analyses et de la découverte de nouveaux organismes vivants. Les algues font partie des végétaux et leur nomenclature est fixée par le *Code international de nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes*. Cette désignation est récente, il s'agit de la nouvelle appellation du *Code International de Nomenclature Botanique* (McNeill *et al.*, 2011). Dans cette classification, les macro- et microalgues sont réunies au sein de mêmes familles. A l'heure actuelle, en classification phylogénétique, les algues sont classées en 11 embranchements : 1 procaryote et 10 eucaryotes (De Reviers, 2003). Selon les auteurs, les nombres de genres et d'espèces incluses dans les différents embranchements d'algues varient.

Synthèse bibliographique

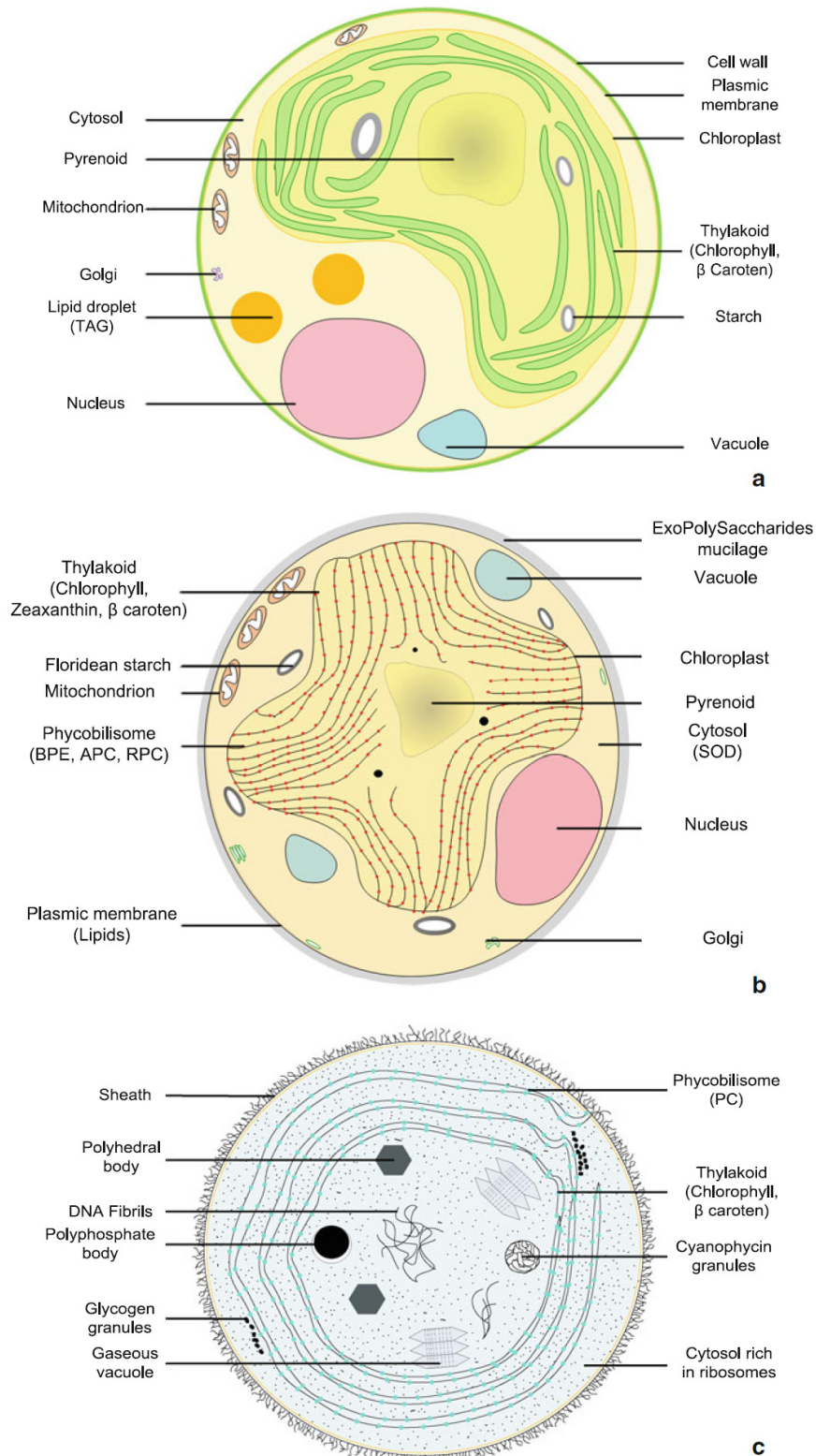


Figure 1 Ultrastructure de microalgues (Pignolet *et al.*, 2013). Cellules de microalgues : verte (a) rouge (b) et cyanobactérie (c).

Synthèse bibliographique

Les données apportées ci-après sont celles décrites par De Reviers (2003) qui propose l'une des classifications les plus précises pour les algues. Les grandes généralités de ces différents embranchements sont données ci-après sachant que ceux correspondant aux microalgues et notamment aux microalgues rouges seront détaillés de façon plus précise dans la suite du manuscrit.

Embranchement des Cyanophyta

Ces algues sont des procaryotes qui possèdent une paroi constituée de peptidoglycane à base d'acide muramique et de N-acétylglucosamine. On y distingue les cyanobactéries et les prochlorophytes. Cet embranchement comprend 7500 espèces (Kornprobst, 2005). Ces bactéries photosynthétiques entrent dans la classification des algues car elles possèdent de la chlorophylle *a* et parfois de la chlorophylle *d*. La chlorophylle *d* est principalement présente chez les cyanobactéries telles que *Acaryochloris marina* (Iwamoto *et al.*, 2012 ; Gupta *et al.*, 2013).

Les cyanobactéries, contrairement aux prochlorophytes, possèdent deux photosystèmes (I et II) et des phycobilisomes. Le phycobilisome est un système secondaire de collecte des électrons, constitué de pigments photosynthétiques dit surnuméraires. Le glycogène est le polysaccharide de réserve des cyanophytes. Il existe également une réserve de carbone sous forme de gouttelettes lipidiques et parfois sous forme de granules de polyhydroxybutyrate. Elles possèdent également une réserve d'azote sous forme de grains de cyanophycine (polypeptide constitué d'arginine et d'asparagine). Les prochlorophytes encore peu connues, sont dispersées au sein des cyanobactéries et constituent un groupe de trois genres (*Prochlorococcus*, *Prochloron* et *Prochlorothrix*). La classification phylogénétique des Cyanophyta n'est pas complète car il n'existe pas suffisamment d'informations sur les organismes constitutifs de cet embranchement (De Reviers, 2003). Cependant un essai de classification des cyanobactéries a été proposé par Kornprobst (2005) (Tableau 1).

Synthèse bibliographique

Tableau 1 Classification des cyanobactéries (Kornprobst, 2005).

Classe	Ordre	Familles	Genres
Coccogoneae	Chroococcales	Chroococcaceae	<i>Anacystis</i> , <i>Aphanothece</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i>
Hormogoneae	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Hormothamnion</i>
		Rivulariaceae	<i>Calothrix</i> , <i>Isactis</i> , <i>Rivularia</i>
		Scytonemataceae	<i>Plectonema</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Tolypothrix</i>
	Oscillatoriales		<i>Lyngbya</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Symploca</i>
	Pleurocapsales		<i>Dermocarpa</i> , <i>Xenococcus</i> , <i>Hyella</i> <i>Entophysalis</i> , <i>Gloeocapsa</i>
	Stigonematales		<i>Hapalosiphon</i> , <i>Kiriththrix</i> , <i>Stigonema</i>

Les algues vertes (Streptophyta et Chlorophyta)

Les algues vertes ne sont pas regroupées dans un embranchement, mais sont réparties en deux infra-règnes (ou infrarègnes) : les Streptophyta et les Chlorophyta. Les Chlorophyta sont exclusivement des algues alors que les Streptophyta sont composées d'algues et d'embryophytes. Les embryophytes sont en grande partie des plantes terrestres. Les algues vertes constituent un groupe polyphylétique d'organismes constitué de 550 à 570 genres, représentés par plus de 16 000 espèces (Tableau 2). Les Chlorophyta contiennent 3 000 espèces et les Streptophyta 13 000 espèces. Les caractéristiques communes aux algues des deux infra-règnes sont, les pigments photosynthétiques (chlorophylles *a* et *b*) et l'amidon qui est la substance de réserve intraplastidiale.

Tableau 2 Classification des algues vertes (De Reviers 2003).

Infra-règne : Les Chlorophyta	
Principaux ordres	Principaux genres
Classe des Prasinophyceae	
Mamiellales	<i>Micromonas</i>
Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>
Pseudoscourfieldiales	<i>Nephroselmis</i>
Chlorodendrales	<i>Tetrselmis</i>
Classe des Pedinophyceae	
Pedinomonadales	<i>Pedinomonas</i>

Synthèse bibliographique

Tableau 2 (suite) Classification des algues vertes (De Reviers 2003).

Infra-règne : Les Chlorophyta	
Principaux ordres	Principaux genres
Classe des Ulvophyceae (<i>lato sensu</i>)	
Ulotrichales	<i>Acrosiphonia, Chlorocystis, Ulothrix, Urospora</i>
Ulvales	<i>Enteromorpha, Ulva, Ulvaria, Endophyton, Entocladia</i>
Cladophorales	<i>Chaeromorpha, Anadyomene, Cladophora, Rhizoclonium</i>
Bryopsidales	<i>Bryopsis, Codium, Derbesia</i>
Halimadales	<i>Halimeda, Caulerpa, Penicillius</i>
Classe des Chlorophyceae	
Dunaliellales	<i>Asteromonas, Dunaliella</i>
Chlamydomonadales	<i>Chlamydomonas, Haematococcus</i>
Volvocales	<i>Volvox, Gonium</i>
Chlorococcales	<i>Chlorococcum, Botryococcus</i>
Chlorosardinales	<i>Chlorosarcinopsis, Chlorosarcina</i>
Sphaeroplacales	<i>Sphaeroplaca, Atractomorpha</i>
Microsporales	<i>Microspora</i>
Chaetopeltidales	<i>Hormotilopsis, Planophila, Dicranochaete, Schizochlamys</i>
Classe des Trebouxiophyceae	
Trebouxiales	<i>Chlorella, Trebouxia</i>
Microthamniales	<i>Microthamnium</i>
Prasiolales	<i>Prasiola</i>
Infra-règne : Les Streptophyta	
Ordres	Principaux genres
Classe des Mesostigmatophyceae	
Mesostigmatophytale	<i>Mesostigma</i>
Classe des Chlorokybophyceae	
Klorokybophytales	<i>Chlorokybus</i>
Classe des Klebsormidiophyceae	
Klebsormidiophytale	<i>Klrbsormidium, Stichococcus, Entransia</i>
Classe des Zygnematophyceae	
Zygnematales	<i>Micrasterias, Spirogyra, Zygnema</i>
Classe des Coleochaetophyceae	
Coleochaetophytales	<i>Coleochaete, Chaetosphaeridium, Awadhiella</i>

Synthèse bibliographique

Embranchement des Rhodophyta (ou algues rouges)

Les algues rouges sont un groupe monophylétique de la division des Rhodophyta. Il est constitué de 700 genres, avec plus de 10 000 espèces réparties en 11 ordres divisés en deux sous classes : les Bangiophyceae (3 ordres et 3 familles) et les Floridophyceae (8 ordres et 44 familles) d'après Lüning (1990) et Silva et Moe (1997) (Tableau 3). Les Bangiophyceae sont principalement des algues unicellulaires et sont considérées comme des formes primitives d'algues rouges. Les Floridophyceae sont majoritairement des algues pluricellulaires et macroscopiques. Ce sont des algues de tailles moyennes (jusqu'à 1 mètre) et souvent épiphytes, c'est-à-dire qu'elles se développent sur d'autres végétaux. C'est l'un des trois embranchements d'algues qui possèdent un phycobilisome. Les pigments utilisés par ces algues sont la chlorophylle *a* et parfois de la chlorophylle *d*, ainsi que des pigments qualifiés de surnuméraires tels que la phycoérythrine, la phycocyanine, l'allophycocyanine, de l'alpha et du bêta-carotène et des xanthophylles (la lutéine et la zéaxanthine). La substance de réserve est l'amidon floridéen (ou rhodamidon). Les cellules des algues rouges sont non flagellées.

Les Rhodophyta sont des algues majoritairement pluricellulaires. Les microalgues de cet embranchement possèdent un pyrénoïde au centre de la cellule à l'intérieur du chloroplaste et de l'amidon floridéen (rhodamidon). L'appareil de Golgi est généralement associé aux mitochondries (*Porphyridium*). Les microalgues rouges sont entourées d'un mucilage exopolysaccharidique complexe (Figure 1).

Embranchement des Glaucophyta

Il existe dans cet embranchement, 3 genres et 14 espèces d'algues. Ce sont des algues unicellulaires, parfois coloniales. Elles possèdent un amidon extraplastidial et les crêtes mitochondriales sont aplaties. La chlorophylle constitutive des algues est de type *d*. Certaines espèces possèdent des flagelles (*Cyanophorae* en possède deux) ou un pseudo-cil (*Gloeochaete*).

Embranchement des Cryptophyta

Ce sont des algues unicellulaires flagellées (deux flagelles). L'amidon (de type floridéen) est présent sous forme de grains dans le compartiment périplastidial. Les pigments chlorophylliens sont la chlorophylle *a* et *c2*. Elles contiennent également des pigments surnuméraires constitutifs d'un phycobilisome tels que des pigments rouges (phycoérythrobilines) ou des pigments bleus (phycocyanobilines).

Synthèse bibliographique

Tableau 3 Classification des algues rouges marines (Silva et Moe, 1997).

Ordres	Nb. de familles	Principales familles	Principaux genres
Sous classe des Bangiophyceae			
Bangiales	1	Bangyaceae	<i>Bangia, porphyra</i>
Erythropeltidales	1	Erythrotrichiaceae	<i>Erythrotrichia</i>
Porphyridiales	1	Porphyridiaceae	<i>Asterocystis, Porphyridium, Rhodella</i>
Sous classe des Florideophyceae			
Acrochaetiales	1	Acrochaetiaceae	<i>Acrochaetium, Kylinia, Rhodocordon</i>
Céramiales	4	Ceramiaceae	<i>Aglaothamnion, Antithamnion</i>
		Dasyaceae	<i>Dasya, Dictyurus, Heterosiphonia</i>
		Rhodomelaceae	<i>Acanthophora, Amansia, Bostrychia</i>
Cryptonémiales	9	Corollinaceae	<i>Amphiroa, Bossiella, Corallina, Fosliella</i>
		Cryptonemiaceae	<i>Cryptonemia, Grateloupia, Halymenia</i>
		Dumontiaceae	<i>Constantinea, dilsea, Dumontia</i>
		Kallymeniaceae	<i>Callophylis, Kallymenia</i>
		Peyssonneliaceae	<i>Peyssonnelia</i>
		Rhizophyllidaceae	<i>Chondrococcus, Ochtodes</i>
		Weeksiaceae	<i>Constantinea</i>
Gélidiales	3	Gelidiaceae	<i>Acanthopeltis, Gelidiella, Gelidium</i>
		Wurde mann iaceae	<i>Wurde mann ia</i>
Gigartinales	18	Caulacanthaceae	<i>Catenella, Rhabdonia</i>
		Furcellariaceae	<i>Furcellaria</i>
		Gigartinaceae	<i>Chondrus, Gigartina, Iridaea</i>
		Gracilariaceae	<i>Gracilaria, Gracilariopsis</i>
		Gymnophlanceae	<i>Schizymenia</i>
		Hypneaceae	<i>Hypnea</i>
		Petrocelidaceae	<i>Mastocarpus</i>
		Phyllophoraceae	<i>Ahnfeltia, Gymnogongrus, Phyllophora</i>
		Rhizophyllidaceae	<i>Cystoclonium, Portiera, Rhodophyllis</i>
		Solieriaceae	<i>Agardhiella, Eucheuma, Kappaphycus</i>
		Sphaerococcaceae	<i>Caulacanthus, Phacelocarpus</i>
Némaliales(Némalionales)	5	Bonnemaisoniaceae	<i>Asparagopsis, Bonnemaisonia, Delisea</i>
		Chaetangiaceae	<i>Galaxaura, Scinaia</i>
		Helminthocladiaceae	<i>Helminthocladia, Liagora</i>
		Nemaliaceae	<i>Nemalion, Trichogloeae</i>
Palmariales	2	Pal mariaceae	<i>Palmaria</i>
Rhodyméniales	2	Champiaceae	<i>Champia, Lomentaria</i>
		Rhodymeniaceae	<i>Ceratodictyon, Fauchea, Rhodymenia</i>

Synthèse bibliographique

Embranchement des Euglenozoa, classe des Euglenophyceae

Les algues de cet embranchement sont représentées par 40-50 genres et 650-1 050 espèces. Ce sont des algues unicellulaires parfois flagellées et rarement en colonie. Le glucane de réserve, qualifié de paramylon possède une structure voisine de la laminarine qui est un β -(1,3)-glucane ramifié. Les cellules possèdent une structure péricellulaire particulière appelée pellicule. Cette pellicule est constituée de bandes de protéines que l'on retrouve sous la membrane plasmique des algues. Elles contiennent de la chlorophylle *a* et *b* et parfois des caroténoïdes (bêta-carotène, néoxanthine, diadinoxanthine...). La composition en pigment varie avec l'espèce et les conditions environnementales.

Embranchement des Cercizoa, classe des Chlorarachniophyceae

Il est composé de 5 genres et 6 espèces d'algues (*Bigelowiella*, *Chlorarachnion*...). Ce sont des algues unicellulaires, mono-flagellées et principalement multi-plastes (le noyau de *Lotharella amoebiformis* peut contenir plus de 15 plastes). Les chlorophylles *a* et *b* sont présentes chez ces algues, avec des caroténoïdes tels que le bêta-carotène. La molécule de réserve est un β -(1,3) glucane. Il est vésiculaire et recouvre généralement le pyrénioïde.

Embranchement des Haptophyta

Il est composé de 80 genres et de 300 espèces. Ce sont des algues unicellulaires avec deux flagelles, principalement planctoniques et marines. Elles contiennent des chlorophylles *a*, *c1* et *c2*, et leur produit de réserve est de la chrysolaminarine (β -(1,3)-glucane). Cet embranchement comprend deux classes de microorganismes. La classe des Pavlovophyceae est constituée d'un ordre et d'une famille avec quatre genres d'algues : *Diacronema*, *Exanthemachrysis*, *Pavlova*, et *Rebecca*. La classe des Prymnesiophyceae contient quatre ordres : Phaeocystales, Prymnesiales, Isochrysidales, et Coccolithales.

L'embranchement des Dinophyta

Les Dinophyta comprennent 550 genres et 4 000 espèces. Ce sont des microorganismes unicellulaires qui possèdent deux flagelles. Ils sont aussi appelés dinoflagellés. La photosynthèse est réalisée grâce aux chlorophylles *a* et *c2* et des pigments surnuméraires comme le bêta-carotène et des xanthophylles (péridinine). La source d'énergie de stockage est l'amidon, présent sous forme de grains dans le cytoplasme des cellules. L'embranchement compte quatre classes (Tableau 4).

Tableau 4 Classification de l’embranchement des Dinophyta

Classe	Ordre	Principaux Genre
Dinophyceae	Gymnodinales, Ptychodiscales, Suessiales, Gonyaulacales, Peridinales, Nannoceratopsiales, Dinophysiales, Prorocentrales, Desmocapsales, Phytodinales, Thoracosphaerales	<i>Goniolax</i> , <i>Gymnodium</i> , <i>Dinophysis</i>
Blastodiniophyceae	Blastodinales	<i>Blastodinium</i>
Noctiluiphyceae	Noctilucales	<i>Noctiluca</i>
Syndiniophyceae	Syndiniales	<i>Amoebophrya</i>

L’embranchement des Ochrophyta

Les Ochrophyta sont aussi qualifiées d’algues brun-doré. Cet embranchement contient de nombreuses classes, dont le nombre varie selon les auteurs. Cependant les analyses génétiques couplées à la comparaison morphologique permettent de décrire, de façon cohérente, 13 classes contenant plus de 650 genres. La plupart des algues de ces classes sont unicellulaires et flagellées (Tableau 5). Les Ochrophyta sont des algues en général marines et possédant de la Chlorophylle *a* et *c*.

1.1. Les différents embranchements ou classes de microalgues

Les embranchements des Glaucophytes, Dinophytes, Haptophytes, Cryptophytes, Cyanophytes et les classes des Chlorarachniophyceae et des Euglenophyceae, sont exclusivement des microalgues. Parmi les algues vertes, les classes des Prasinophyceae, des Pedinophyceae et des Mesostigmatophyceae sont aussi des algues unicellulaires. L’embranchement des Ochrophyta contient 10 classes d’organismes uniquement unicellulaires et essentiellement flagellées. L’embranchement des Rhodophytes et les classes des Tribophyceae et des Phaeophyceae sont constitués de macro et de microalgues alors que la classe des Chrysomerothrix ne compte que des macroalgues (De Reviers, 2003).

1.1.1. Taxonomie des microalgues rouges

Les algues rouges sont des organismes essentiellement aquatiques, majoritairement marins et benthiques et n’ont pas de flagelle. La plupart des algues rouges unicellulaires appartiennent à la sous classe des Bangiophyceae, dans l’ordre des Porphyridiales et sont représentées par les genres *Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodosorus* et *Dixoniella*. Ce sont des microalgues qui possèdent un pyrénoïde et un plaste en forme d’étoile (ou lobé). Ces microalgues se reproduisent par division cellulaire. Les algues rouges contiennent des chlorophylles *a* et *d*, ainsi que des pigments surnuméraires, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines. Les pigments surnuméraires sont présents en quantités variables et sont responsables de la couleur rouge des

Synthèse bibliographique

Tableau 5 Classification des Ochrophyta

Ordres	Principaux genres
Classe des Diatomophyceae	
Centrales	<i>Chaetoceros, Skeletonema, Paralia</i>
Pennales	<i>Thalassionema, Asterionellopsis</i>
Classe des Bolidophyceae	
Non affilié	<i>Bolidomonas</i>
Classe des Parmophyceae	
Parmales	<i>Pentalamina</i>
Classe des Pelagophyceae	
Pelagomonadales	<i>Pelagococcus</i>
Sarcinochrysidales	<i>Ankylochrysislutea, Aureoumbra lagunensis, Chrysocystis</i>
Classe des Dictyochophyceae	
Rhizochromulinales	<i>Rhizochromulina</i>
Pedinellales	<i>Cyrtophora, Pseudopedinella</i>
Dictyochaes	<i>Dictyocha</i>
Classe des Pinguiphyceae	
Pinguiochrysidales	<i>Pinguiochrysis, Glossomastix</i>
Classe des Raphidophyceae	
Chattonellales	<i>Heterosigma</i>
Classe des Phaeothamniophyceae	
Phaeothamniales	<i>Phaeothamnion</i>
Classe des Tribophyceae	
Vaucheriales	<i>Vaucheria</i>
Classe des Chrysomerophyceae	
Chrysomeridales	<i>Chrysomeris</i>
Classe des Phaeophyceae	
Ascoseirales	<i>Rissoella</i>
Ectocarpales	<i>Ectocarpus, Chorda, Dictyosiphon, Punctaria, Scytosiphon</i>
Fucales	<i>Fucus, Ascophyllum, Pelvetia, Sargassum</i>
Ralfsiales	<i>Ralfsia</i>
Scytothamniales	<i>Scytothamnus</i>
Sphacelariales	<i>Cladostephus, Stypocaulon</i>
Tilopteridales	<i>Phaeosiphomiella</i>
Classe des Eustigmatophyceae	
Eustigmatales	<i>Eustigmato</i>
Classe des Chrysophyceae	
Hibberdiales	<i>Chromophyton, Hibberdia, Stylococcus</i>
Hydrurales	<i>Phaeodermatium</i>
Ochromonadales	<i>Monadodendron</i>

Synthèse bibliographique

algues. Cette composition pigmentaire particulière permet aux algues de s'adapter à la vie en eaux profondes jusqu'à plus de 250 m de profondeur. La culture de ces organismes pour la production de molécules d'intérêt, ne peut se faire qu'en reproduisant leur environnement aquatique. Il est donc important de déterminer les différents paramètres de culture pour l'obtention de ce type de biomasse.

1.1.2. Les microalgues marines rouges du genre *Rhodella*

1.1.2.1. Classification des *Rhodella*

Les microalgues du genre *Rhodella* ont été décrites pour la première fois par Evans en 1970. La première espèce qui entra dans cette catégorie fut nommée *Rhodella maculata*. La taxonomie la plus récente associée à ces microalgues est décrite dans la banque de données Algaebase [1] (Figure 2).

Division : RHODOPHYTA

Sous-division : RHODELLOPHYTINA

Classe : RHODELLOPHYCEAE

Ordre : *RHODELLALES*

Famille : *RHODELLACEAE*

Genre : *Rhodella*

Espèce : *violacea*

Figure 2 Taxonomie de l'espèce *R. violacea* (Cavalier-Smith, 1998 ; Yoon *et al.*, 2006).

La taxonomie de ce genre de microalgue rouge a subi plusieurs remaniements récents. En effet, il existait auparavant quatre espèces associées au genre *Rhodella* : *Rhodella grisea* (Fresnel *et al.*, 1989), *Rhodella cyanea* (Billard et Fresnel, 1986), *Rhodella reticulata* (Deason *et al.*, 1983) et *Rhodella maculata* (Evans, 1970). Suite à des analyses basées sur la comparaison de l'ultrastructure du chloroplaste et de son association au noyau, puis des comparaisons de séquences de l'ADN codant pour l'ARNr18S, les microalgues *R. reticulata* et *R. grisea* ont été classées comme une seule espèce appartenant au genre *Dixoniella* (*D. grisea*) (Scott *et al.*, 1992) tandis que *R. cyanea* est devenue *Neorhodella cyanea*

Synthèse bibliographique

(Scott *et al.*, 2008). Ces microalgues font donc désormais partie de la famille des Dixoniaceae. D'autre part, des études d'ultrastructure du chloroplaste et du cytoplasme ont permis de révéler que *R. maculata* et *R. violacea* ne sont qu'une seule et unique espèce baptisée *R. violacea*. Ainsi, les principales caractéristiques ultrastructurales de cette nouvelle espèce sont la matrice du pyrénioïde qui ne contient pas de thylacoïdes et l'appareil de Golgi qui est associé uniquement avec le réticulum endoplasmique (Scott *et al.*, 2011). Il est à noter que la microalgue *Rhodella violacea* avait été initialement identifiée par Kornmann (1965) qui l'apparenta au genre des *Porphyridium* sous l'appellation de *Porphyridium violaceum*. C'est Wehrmeyer en 1971 qui la baptisa *Rhodella violacea* après avoir déterminé que les caractéristiques structurales de cette microalgue étaient plus proches de celles du genre *Rhodella* que de celles du genre *Porphyridium*. Le terme violacea/violaceum fait référence à la couleur bleu-rouge des cellules. Elles sont d'un diamètre de 8-14 µm, et sont entourées d'un mucilage exocellulaire d'épaisseur variable. Les microalgues appartenant au genre *Rhodella* sont des microalgues marines planctoniques. Elles se développent dans des eaux froides à tempérées principalement localisées dans l'hémisphère Nord. On les trouve en Europe : Grande Bretagne (Evans, 1970 ; Guiry, 1997 ; Hardy et Guiry, 2003), France (Dizerbo et Herpe, 2007), Norvège (Paasche et Throndsen, 1970), Suède (Nitschke *et al.*, 2011) et Scandinavie (Athanasiadis, 1996). Elles ont également été identifiées en Amérique du Nord (Nitschke *et al.*, 2011 ; Scagel *et al.*, 1989) et au Japon (Yoshida, 1998).

1.1.2.2. Caractérisation structurale des *Rhodella*

Les microalgues du genre *Rhodella* se différencient des autres genres au niveau moléculaire et structural. *Rhodella violacea* est une archéthalle non mobile, c'est-à-dire que toutes les cellules ont un rôle identique et ne possèdent pas de flagelle. Les microalgues *R. violacea* sont sphériques et elles possèdent une membrane plasmique double. Elles sécrètent un exopolysaccharide sulfaté complexe qui forme une capsule autour de la cellule. Les cellules mesurent entre 7 et 13 µm de diamètre. Le pyrénioïde (parfois 2 pyrénioïdes) est intraplastidial (chloroplaste), excentré, et mesure 3 µm de diamètre, soit un diamètre équivalent à celui du noyau (Scott *et al.*, 2011 ; Yokoyama *et al.*, 2004). Il est relié au noyau qui est situé au centre de la cellule. C'est une structure dense, hyaline, différenciée et généralement entourée d'amidon. La matrice du pyrénioïde ne contient pas de thylacoïde ni de structure interne mais des protéines, dont des enzymes qui participent à la photosynthèse (principalement la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase ou RuBisCO). Les chloroplastes ont une membrane plastidiale double et sont en forme d'étoiles avec des lobes en périphérie de la cellule. Les

Synthèse bibliographique

thylacoïdes des chloroplastes sont abondants et espacés les uns des autres. Des plastoglobuli (globules denses en électrons) sont présents au niveau des lobes des chloroplastes situés à proximité de la membrane de la cellule. Le réticulum endoplasmique est présent en périphérie des cellules et il est connecté à la membrane cellulaire par des tubules. Les mitochondries ont des crêtes aplaties et elles sont essentiellement localisées à proximité des dictyosomes (empilement de saccules appartenant à l'appareil de Golgi) en périphérie de la cellule (Figure 3).

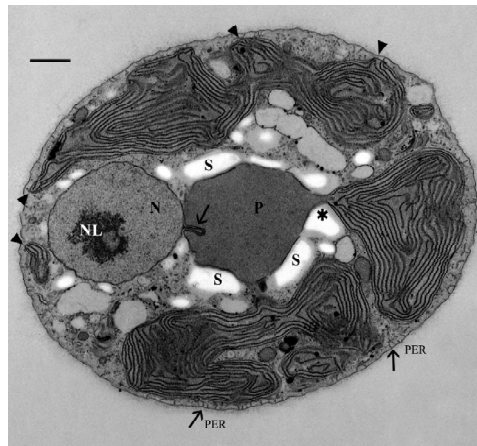


Figure 3 Ultrastructure de *Rhodella violacea* sous microscope électronique à transmission (Scott *et al.*, 2011). N (noyau), NL (nucléole), P (pyrénoïde), S (grains d'amidon), PER (réticulum endoplasmique périphérique), * (connexion entre le thylacoïde du chloroplaste et le pyrénoïde). La barre d'échelle représente 1 μm .

Les microalgues du genre *Rhodella* produisent de l'amidon floridéen (ou rhodamidon) comme substance de réserve. Ce polymère est toujours intra-cytoplasmique et contrairement aux végétaux supérieurs et aux algues vertes, il n'est pas présent dans les plastes. L'amidon floridéen est associé à une protéine de masse moléculaire inférieure à $67\,000\text{ g.mol}^{-1}$. Il est présent sous forme de grains autour du pyrénoïde et du noyau (Rahaoui, 1999).

1.2. Photosynthèse et microalgues

1.2.1. Généralités

La photosynthèse est un processus indispensable à la vie en permettant l'utilisation de l'énergie solaire (énergie lumineuse) pour la formation de la matière organique. Les microorganismes photosynthétiques sont responsables de plus de 50% de la photosynthèse et sont à la base de la chaîne alimentaire.

Synthèse bibliographique

La photosynthèse est le processus qui permet la réduction du dioxyde de carbone par l'eau en présence de lumière, pour la formation d'hydrates de carbone et d'oxygène.

Chez les plantes, la photosynthèse a lieu dans les chloroplastes. Les chloroplastes sont des organites intracellulaires d'une dizaine de microns (Figure 4) possédant une double enveloppe qui délimite le stroma où se trouvent les thylacoïdes, de l'ADN, des ribosomes, des réserves énergétiques sous forme d'amidon, et des gouttelettes lipidiques dont le rôle reste encore indéterminé. C'est au niveau des thylacoïdes, ensemble de membranes formant des saccules et contenant les pigments photosynthétiques qu'a lieu la photosynthèse.

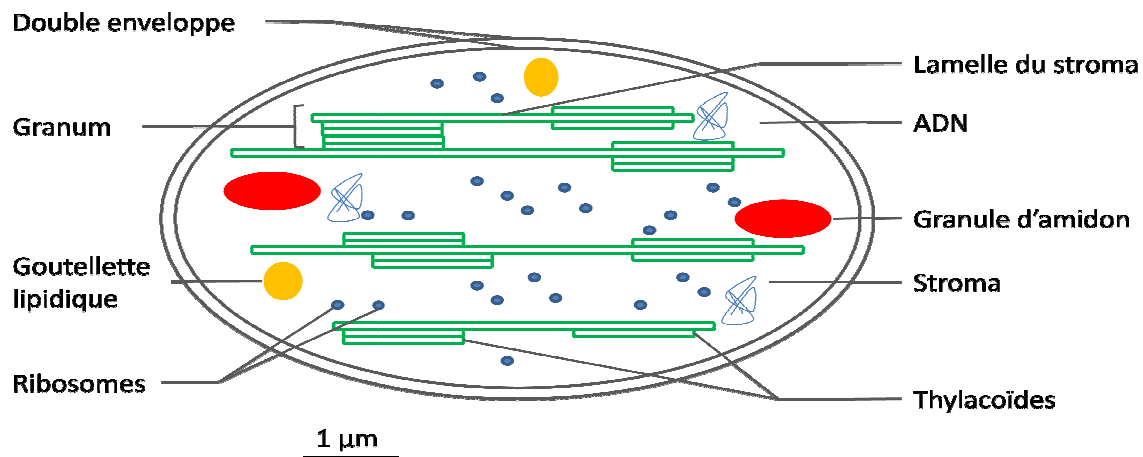


Figure 4 Structure du chloroplaste.

La photosynthèse se déroule en deux phases. Une phase lumineuse qui est l'absorption de l'énergie lumineuse par les pigments photosynthétiques, pour la formation de molécules énergétiques : le NADPH et l'ATP. Une phase sombre (ou obscure) durant laquelle il y a formation de glucides grâce à l'énergie chimique obtenue en phase lumineuse, au dioxyde de carbone et à l'eau.

La phase lumineuse

Les réactions de la phase lumineuse se déroulent au niveau des membranes des thylacoïdes, où se trouvent les pigments qui sont les photorécepteurs formant des antennes collectrices de photons. Il existe deux catégories de pigments : les chlorophylles qui sont les pigments principaux, et les pigments surnuméraires que sont les caroténoïdes et les phycobilines. Les chlorophylles sont présents chez tous les organismes autotrophes pour le carbone (végétaux supérieurs, algues, bactéries photosynthétiques...), les caroténoïdes sont retrouvés chez la

Synthèse bibliographique

quasi-totalité des photoautotrophes alors que les phycobilines sont spécifiques aux algues rouges (les phycobilines de type *R* (Rhodophyte)), aux Glaucophytes et aux cyanobactéries (phycobilines de type *C* (Cyanophyte)) (Kornprobst, 2005). Les phycobilines sont les éléments constitutifs du phycobilisome.

La lumière ou radiation électromagnétique, se propage sous la forme de photons avec une énergie **E**, qui peut être définie par la loi de Planck (Equation 1).

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad \text{Equation 1}$$

E : énergie des photons (kJ.einstein^{-1}) ; h : constante de Planck = $6,626.10^{-34}\text{J.s}$; c : vitesse de la lumière = $2,998.10^8 \text{ m.s}^{-1}$; ν : fréquence de la radiation ; λ : longueur d'onde (m).

La loi de Planck permet d'établir la relation suivante : plus la longueur d'onde est basse plus la lumière est énergétique. La quantité de lumière absorbée par les pigments, pour une longueur d'onde donnée, obéit à la loi de Beer-Lambert (Equation 2).

$$A = \log I_0/I = \epsilon lc \quad \text{Equation 2}$$

A : absorbance ; I_0 : intensité de la lumière incidente ; I : intensité de la lumière transmise ; c : concentration molaire de l'échantillon ; l : longueur en cm du trajet optique et ϵ le coefficient d'extinction molaire ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Les principaux pigments photosynthétiques

La chlorophylle est un tétrapyrrole variablement substitué par des groupements carbonés (méthyle, aldéhyde) et construit autour d'un atome de magnésium (Figure 5). Cette structure est substituée par une chaîne phytyle.

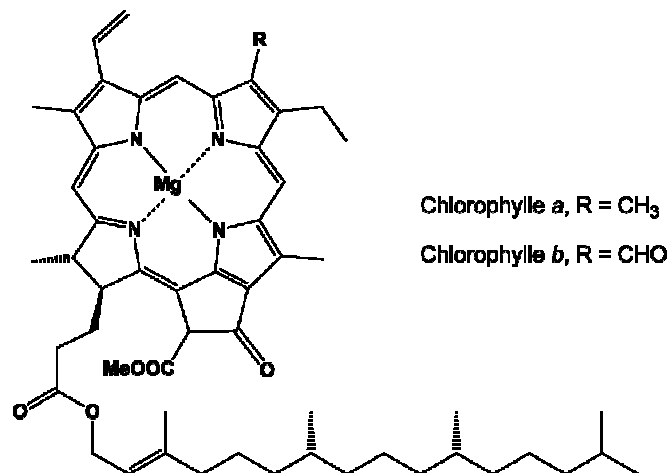


Figure 5 Structure des chlorophylles *a* et *b* [2].

Synthèse bibliographique

Il existe différentes chlorophylles dont la structure moléculaire varie en fonction des substituants (Figure 6 et Figure 7).

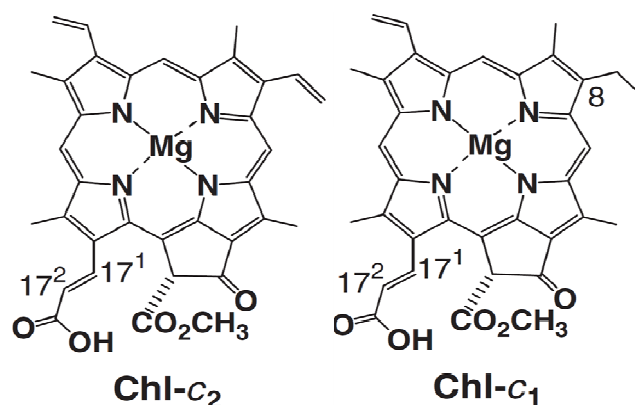
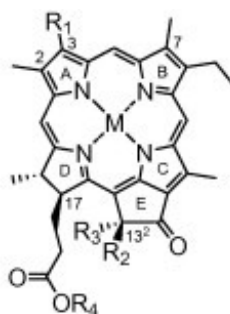


Figure 6 Structure des chlorophylles c_1 et c_2 (Mizoguchi *et al.*, 2011).



Pigment	M	R_1	R_2	R_3	R_4
Chl- a	Mg	$\text{CH}=\text{CH}_2$	H	COOCH_3	$\text{C}_{20}\text{H}_{39}$
Chl- a'	Mg	$\text{CH}=\text{CH}_2$	COOCH_3	H	$\text{C}_{20}\text{H}_{39}$
Chl- d	Mg	CHO	H	COOCH_3	$\text{C}_{20}\text{H}_{39}$
Chl- d'	Mg	CHO	COOCH_3	H	$\text{C}_{20}\text{H}_{39}$

Figure 7 Structure des chlorophylles a , a' , d et d' (Fukusumi *et al.*, 2012).

La chlorophylle a est présente chez tous les organismes photosynthétiques. Ce sont ces conjugaisons, présentes sur le squelette tétrapyrrolique qui déterminent les différentes caractéristiques spectrophotométriques des chlorophylles et leur confèrent une forte absorption dans le visible (400-800 nm).

Synthèse bibliographique

Les pigments surnuméraires

Les pigments surnuméraires (ou accessoires) permettent d'élargir le spectre d'absorption des organismes dans des régions du spectre différentes de celles de la chlorophylle (Figure 8).

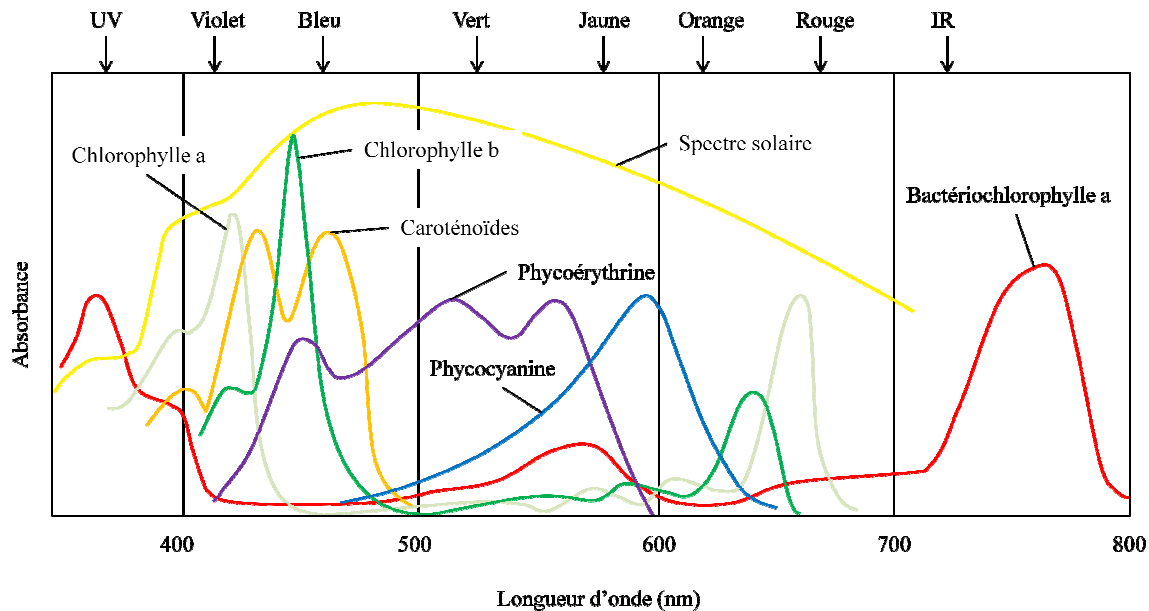


Figure 8 Spectres d'absorption des principaux pigments photosynthétiques (Voet et Voet, 2005)

Cette caractéristique permet une adaptation des organismes aux conditions d'irradiance. Les caroténoïdes et les chlorophylles absorbent dans des gammes de longueurs d'ondes de 350 nm à 550 nm (bleu-violet) et de 600 nm à 700 nm (rouge). Les phycobilines absorbent entre 450 et 700 nm (verte, jaune et orange).

Les caroténoïdes sont des tétraterpènes principalement linéaires. Ce sont les pigments surnuméraires les plus rencontrés dans les organismes photosynthétiques.

Les phycobilines sont aussi appelées phycoprotéines. Elles possèdent une structure protéique liée à un tétrapyrrole et ressemblent aux chlorophylles avec un noyau porphyrinique ouvert. Ces pigments sont constitutifs des algues bleues et des algues rouges. Il en existe plusieurs, telles que la phycocyanine de couleur bleu-vert et la phycoérythrine de couleur rouge (Figure 9).

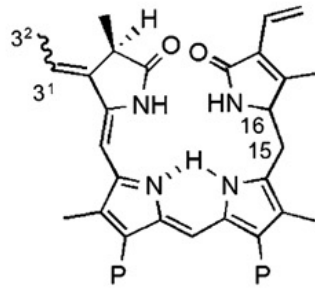


Figure 9 Structure de la phycoérythrine (Wiethaus *et al.*, 2010).

L'énergie lumineuse collectée par les chlorophylles et les pigments surnuméraires est transmise aux centres réactionnels (CR) des photosystèmes localisés dans la membrane des thylacoïdes. L'énergie circule depuis ces différents pigments accessoires vers la chlorophylle des centres réactionnels pour la libération d'électrons. Les électrons libérés conduisent à la formation d'ATP et de NADPH dans le stroma du thylacoïdes. Les cyanobactéries et les eucaryotes photosynthétiques contiennent deux photosystèmes PSI et PSII qui sont en relation via des transporteurs d'électrons et le cytochrome *b6f* (schéma en Z). Le PSI impliqué dans la production du NADPH via un transporteur spécifique, la ferrédoxine, capte la lumière pour des longueurs d'ondes élevées (700 nm). Le PSII est en relation avec le complexe d'oxydation de l'eau pour l'extraction du pouvoir réducteur et capte des longueurs d'ondes plus faibles (680 nm).

Lors du transfert des électrons par les photosystèmes, il y a formation d'un gradient de protons qui est utilisé par une ATP synthase pour la formation d'ATP à partir d'ADP et de P_i . (Figure 10). L'ATP produit, ainsi que le NADPH, sont utilisés par les réactions de la phase obscure.

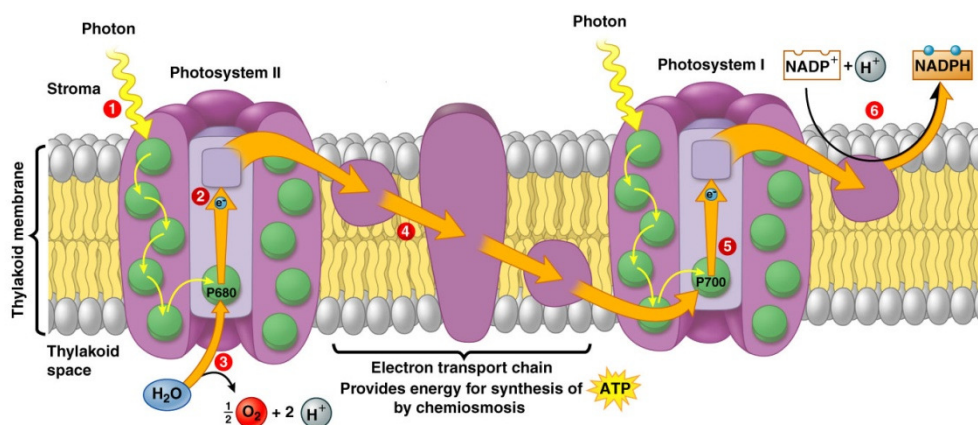
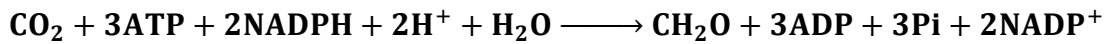


Figure 10 Mécanisme de la photosynthèse (Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings)

Synthèse bibliographique

La phase obscure

La phase obscure est non photochimique. Elle est le siège de réactions permettant la fixation du carbone et la production de molécules osidiques. Durant cette phase, l'ATP et le NADPH formés en phase claire sont utilisés pour la synthèse de la matière organique, et principalement des glucides selon la réaction suivante :



Cette phase se déroule en 4 étapes. Les 3 premières étapes sont cycliques. Elles sont réunies dans le cycle de Calvin et mettent en jeu le ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) et plusieurs enzymes dont la RuBisCO (Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase) (Figure 11). La première étape correspond à la formation de 6 molécules de 3-phosphoglycérate après carboxylation de 3 ribulose-1,5-biphosphate par 3 CO₂. L'enzyme responsable de la réaction, la RuBisCO, est l'enzyme d'initiation du cycle de Calvin. Lors de la seconde étape, le 3-phosphoglycérate est réduit pour former du glycéraldéhyde-3-phosphate qui sera en partie dirigé vers la synthèse des glucides (quatrième étape), l'autre partie servant à régénérer le cycle (troisième étape) en RuBP.

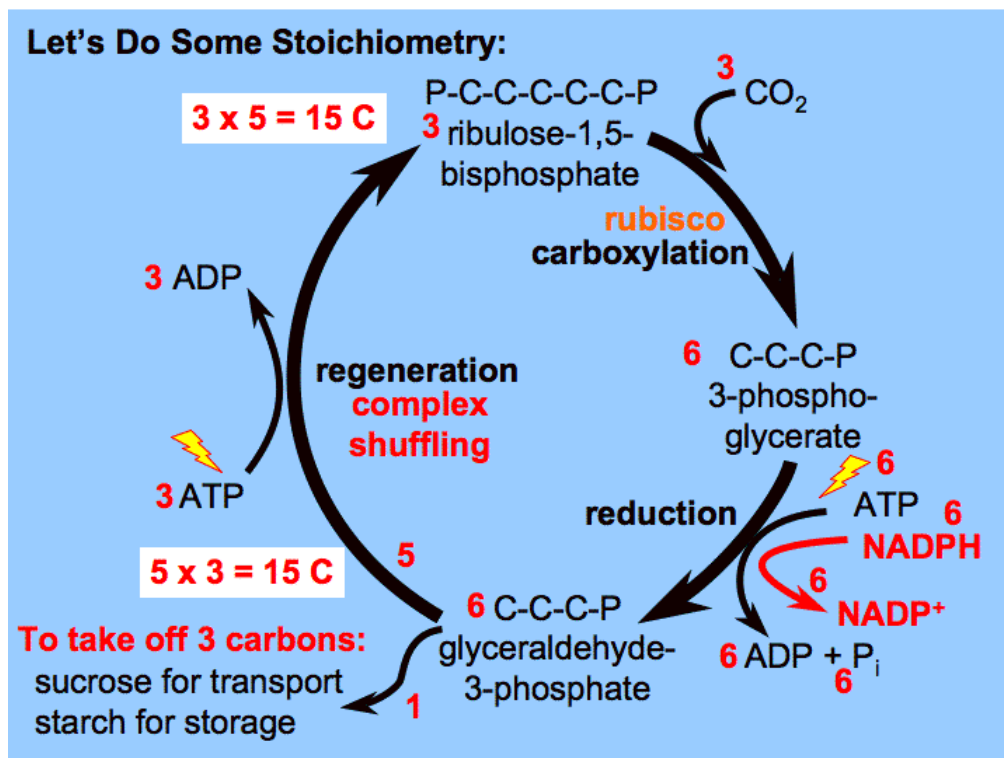


Figure 11 Cycle de Calvin [3]

1.2.2. La photosynthèse chez les microalgues marines rouges

Les microalgues marines vivent à différentes profondeurs. Dans l'eau, la distribution des radiations lumineuses varie avec la profondeur. En effet, plus l'épaisseur de la couche d'eau augmente moins les longueurs d'ondes de plus faible énergie se propagent. Ainsi jusqu'à 25 m de profondeur la quasi-totalité du spectre visible est présent. A partir de -25 m les radiations rouges disparaissent. De -100 à -250 m seules les radiations vertes (500-578 nm) et bleues (446-500 nm) sont encore présentes. La profondeur à laquelle les organismes se développent est grandement conditionnée par leur capacité à utiliser certaines longueurs d'ondes pour le processus photosynthétique du fait d'un avantage évolutif que leur a conféré une composition pigmentaire spécifique. Par conséquent, c'est l'équipement photosynthétique des microalgues qui va définir la profondeur à laquelle elles se développent. Les pigments principaux des algues rouges sont les alpha et bêta-carotènes, les phycobilines et la chlorophylle de type *a*. Les phycobilines des microalgues marines rouges comportent 4 protéines principales : les phycoérythrine, les phycocyanine, les phycoérythrocyanine et les allophycocyanine. Ces pigments ont des spectres d'absorption différents. Ils sont liés entre eux par des polypeptides de type alpha, bêta et parfois gamma (phycobiliprotéines) et forme un complexe appelé le phycobilisome (Mörschel *et al.*, 1980).

Les phycobilisomes sont fixés sur la face externe des membranes des thylacoïdes où ils forment des granulations. Ces complexes permettent de transférer l'énergie sur de longues distances avec un minimum de pertes puisque leur rendement de transfert d'énergie est supérieur à 90% (Voet et Voet, 2005). Ils ont une forme héliodiscoïdale. Le complexe est composé d'un centre tri-cylindrique (allophycocyanine) à partir duquel se développent 6 bras constitués de phycoérythrine et de phycocyanine (Figure 12).

Chez *R. violacea*, le phycobilisome est un complexe supra moléculaire de $790\,000\text{ g.mol}^{-1}$, qui contient de la phycoérythrine et de la phycocyanine avec un ratio 2 : 1 (Koller *et al.*, 1978). L'énergie lumineuse est absorbée par les pigments les plus périphériques, les phycoérythrine. Ces dernières transfèrent ensuite leur énergie vers les phycocyanine. Enfin l'allophycocyanine est l'accepteur final d'énergie de la supra molécule qui transmet l'énergie aux centres réactionnels (CR). Le transfert d'énergie entre les phycobilines s'effectue via des protéines de liaison du complexe spécifique de l'espèce du microorganisme (Mihova *et al.*, 1996 ; Mörschel *et al.*, 1989). Grâce à cet équipement photosynthétique, les Rhodophytes peuvent vivre jusqu'à 250 m de profondeur.

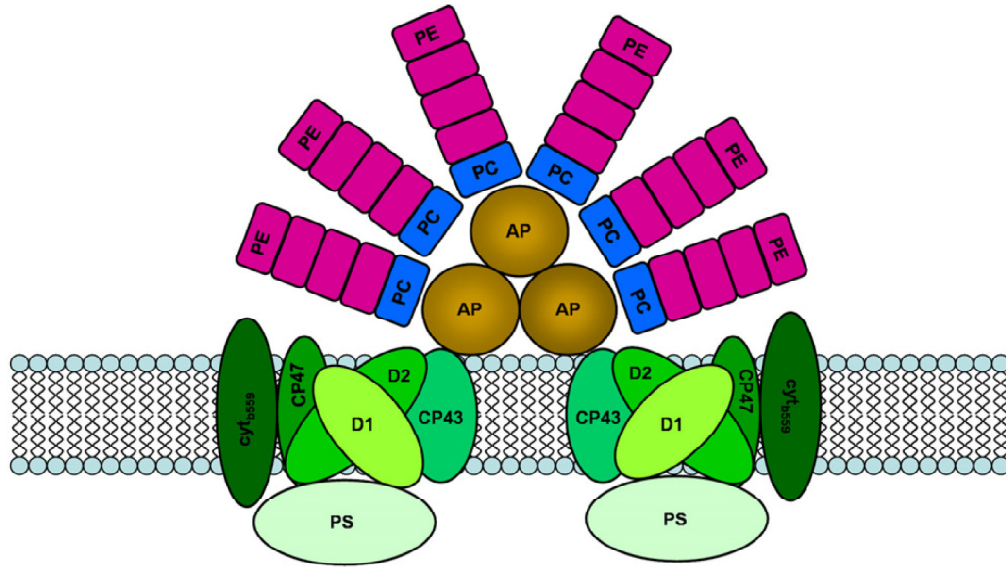


Figure 12 Photosystème de *Prochlorococcus marinus* (Wiethaus *et al.*, 2010). PE : phycoérythrine ; PC : phycocyanine ; AP : allophycocyanine ; D1 et D2 : protéines liées aux chlorophylles ; cyt : cytochrome.

Cette adaptation aux couches d'eaux profondes est en grande partie associée à un contenu important en pigments surnuméraires très photosensibles tels que les phycoérythrines. Ainsi lorsque les microalgues rouges sont exposées à de fortes intensités lumineuses, les phycoérythrines sont détruites, ce qui entraîne un verdissement des cultures. C'est pourquoi, il est important de connaître et de contrôler l'environnement lors de la culture de microalgues.

1.3. Culture des microalgues

Les microalgues sont en mesure de croître sous différentes conditions de culture. Ces conditions de croissance vont faire varier la composition des cellules ainsi que les quantités et les caractéristiques des différentes substances qu'elles produisent. Leur profil de croissance est identique à celui d'autres microorganismes avec trois phases principales : une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire (Figure 13). Selon les conditions de culture, une quatrième phase peut apparaître, la phase de déclin.

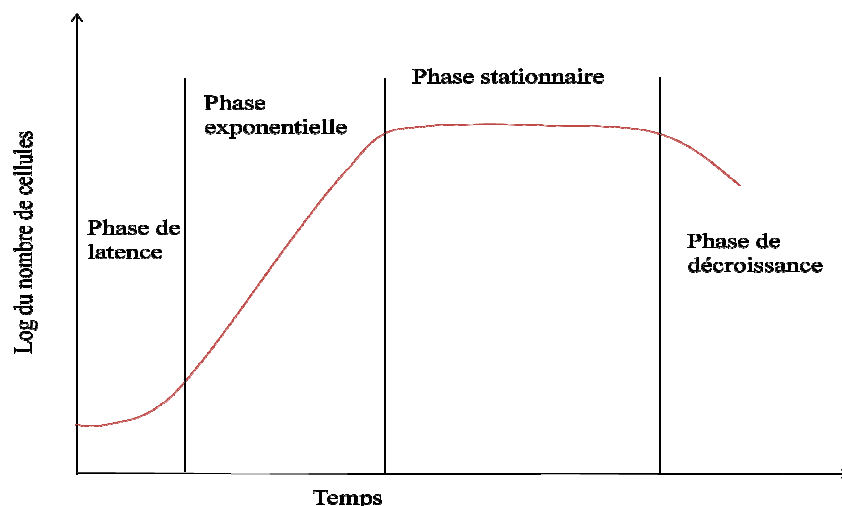


Figure 13 Courbe de croissance des microalgues

1.3.1. Effets de la composition du milieu sur la croissance des microalgues

Les microalgues, (comme la plupart des cellules) sont composées principalement de protéines, de glucides et de lipides (Brown *et al.*, 1997). Pour pouvoir se multiplier, le milieu de culture doit pouvoir subvenir aux besoins des organismes. Cependant, les cellules peuvent adapter leur composition afin de pouvoir se développer dans certaines conditions de stress ou de carence.

1.3.1.1. Le substrat carboné

La principale source de carbone pour les microalgues est le dioxyde de carbone atmosphérique. La culture hétérotrophe (respiration et source de carbone organique) est inappropriée pour la plupart des microalgues et il existe plus d'espèces autotrophes obligatoires que d'hétérotrophes facultatives. Cependant certaines espèces de microalgues telles que celles appartenant au genre *Chlorella* peuvent se développer en hétérotrophie (respiration) et à l'obscurité (Perez-Garcia *et al.*, 2011). La culture hétérotrophe présente un intérêt important puisqu'elle permet de produire de la biomasse et des molécules d'intérêt (lipides, protéines...) avec un rendement plus important que les cultures en autotrophie. Cela peut dans certains cas entraîner une diminution des coûts de production des produits issus de microalgues. Ainsi, les cultures hétérotrophes sont indépendantes des conditions d'irradiance très énergétiques lorsqu'elles ne sont pas naturelles. Cependant, selon Chen (1996) la culture en hétérotrophie est limitée par plusieurs paramètres. Tout d'abord, il subsiste un nombre limité d'espèces de microalgues qui peuvent totalement se développer de façon hétérotrophe même si elles disposent de l'équipement enzymatique nécessaire. L'ajout d'un substrat

Synthèse bibliographique

organique à une culture de microalgues entraîne une adaptation du métabolisme pas toujours favorable en termes de consommation énergétique. La contamination et la concurrence avec d'autres microorganismes est plus importante (contamination bactérienne des cultures). De plus, des phénomènes d'inhibition de la croissance en présence de certains substrats organiques en excès ont également été décrits. Enfin, l'incapacité des microalgues à produire des métabolites dont la synthèse est induite par la lumière est un des problèmes majeurs rencontrés en culture hétérotrophe de microalgues.

La source de carbone utilisée est importante pour les cultures hétérotrophes et le substrat organique le plus efficace est le glucose dont la présence induit un phénomène d'adaptation caractérisé par d'importants changements physiologiques, accompagnés d'un phénomène de stockage de molécules. En effet les cellules augmentent la quantité intracellulaire de polysides, de lipides, de protéines, de chlorophylles, d'ARN et de vitamines, ce qui entraîne un accroissement de leur volume (Perez-Garcia *et al.*, 2011). D'autres molécules comme le glycérol ou l'acétate peuvent également être utilisées comme sources de carbone par les microalgues.

Le choix de la source de carbone (CO_2 ou molécule organique) est important, puisque les changements métaboliques induits par une culture en hétérotrophie impactent significativement et parfois défavorablement sur la production de molécules et de biomasse. Ainsi, la présence d'acétate dans les cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* entraîne une anoxie par diminution de l'activité photosynthétique. Ce phénomène, s'il n'est pas compensé par un apport exogène d'oxygène conduit à la production d'hydrogène jusqu'à $1,4 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, en culture en photobioréacteur (Degrenne *et al.*, 2010).

Le glycérol est une source de carbone qui est moins bien assimilé et permet une croissance des microalgues hétérotrophes plus faible. Une culture de microalgues de type *Schizochytrium mangrovei* PQ6 en présence de $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucose, permet la production de $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasse sèche alors qu'il faut $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glycérol pour obtenir $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasse (Hong *et al.*, 2013).

Les microalgues *Chlorella vulgaris*, peuvent être cultivées en hétérotrophie avec différentes sources de carbone. Mitra *et al.*, (2012) ont cultivé les microalgues en présence de glucose, de vinasse de maïs (alcool) ou de lactosérum de soja. Les auteurs ont observé que la vitesse de croissance est plus rapide en présence de glucose. Cependant, la concentration cellulaire obtenue en phase stationnaire est légèrement plus élevée en présence de vinasse de maïs ($5,6$

Synthèse bibliographique

contre 5,8 g.L⁻¹ de biomasse sèche respectivement). Le phénomène est accentué en mixotrophie (culture en présence d'une source lumineuse mais supplémentée en carbone organique), où la production de biomasse est plus importante qu'en hétérotrophie (7,1 g.L⁻¹ avec du glucose contre 8,3 g.L⁻¹ avec la vinasse de maïs). La présence de lumière stimule la photosynthèse qui couplée à la respiration augmente la division des *C. vulgaris*.

Les cultures de microalgues en autotrophie utilisent le carbone inorganique pour la production des molécules glucidiques. L'origine et la teneur en CO₂ ont un impact sur l'efficacité de la photosynthèse. Le pourcentage de CO₂ dans l'air nécessaire pour alimenter les cultures de microorganismes photosynthétiques varie en fonction du genre auquel appartient ce microorganisme. Ainsi selon Vidyashankar *et al.*, (2013), l'espèce *Scenedesmus dimorphus* présente la meilleure réponse en termes de croissance lors de l'augmentation de la teneur en CO₂ de 0,03% à 1% dans les gaz d'alimentation des photobioréacteurs avec une augmentation de production de biomasse d'un facteur 2. Dans les mêmes conditions, les genres *Chlorococcum* et *Coelastrum* ont une croissance optimale à 0,5% de CO₂ et *Ankistrodesmus* a la meilleure croissance à 0,03%. Les auteurs ne donnent pas d'explication permettant de corréliser la teneur des gaz d'alimentation en CO₂ et la production optimale de biomasse. Cependant d'autres auteurs expliquent ce phénomène par un effet inhibiteur du CO₂ sur la croissance à partir d'une concentration critique (concentration seuil tolérée par les cellules). Selon Yang et Gao (2003) la valeur de la concentration critique dépend de plusieurs paramètres : l'approvisionnement en CO₂, l'affinité des cellules pour celui-ci, le taux de croissance, la taille des cellules (plus la croissance des cellules est rapide, plus elles exigeront des concentrations élevées de CO₂) et la présence d'anhydrase carbonique chez certaines microalgues. L'anhydrase carbonique est une enzyme qui catalyse l'hydratation réversible du CO₂ en bicarbonate et en protons. Ces enzymes, essentielles pour le transport et la fixation du CO₂, sont fortement régulées par le taux de CO₂ (Andersen, 2005).

Il est donc nécessaire d'étudier pour chaque type d'algue les conditions de croissance optimales. Certaines microalgues sont qualifiées de CO₂-tolérantes. Ainsi, les espèces du genre *Desmodesmus* ont une croissance optimale (et similaire) pour des teneurs en CO₂ comprises entre 2 et 10% (Brilman *et al.*, 2013) avec une production de biomasse sèche de 1,2 g.L⁻¹ (sur 8 jours de culture) (Huang *et al.*, 2012a). Huang *et al.* (2012a) ont observé une augmentation de la production de biomasse de *Desmodesmus* de 20% lorsque la teneur en CO₂ passait de 0,038% (teneur atmosphérique) à 2%. Les microalgues du genre *Chlorella* sont également CO₂-tolérantes. Elles peuvent se développer dans un milieu contenant jusqu'à

Synthèse bibliographique

70% de CO₂, en produisant de 0,71 à 0,76 g.L⁻¹ de biomasse (après 6 jours de culture), et elles ont une croissance maximale en présence de 10% de CO₂ (5,7 g.L⁻¹ après 6 jours de culture). Leur croissance est divisée par deux à 50% de CO₂ (Sung *et al.*, 1999a et b, Yue et Chen 2005).

Pour augmenter la croissance cellulaire, le CO₂ peut aussi être apporté en supplémentation au milieu de culture, sous forme de NaHCO₃. A titre d'exemple, une supplémentation du milieu de culture de la souche *Gyrodinium impudicum* par du NaHCO₃ à hauteur de 50 µM, permet d'augmenter jusqu'à 2,3 fois la biomasse finale. Néanmoins au-delà de cette valeur seuil la croissance diminue (Yim *et al.*, 2003).

1.3.1.2. Le substrat azoté

Pour le développement des microalgues, l'azote est indispensable. En effet, c'est un élément constitutif des acides aminés qui composent les protéines et il représente entre 1 et 10% de la biomasse sèche. Dans des cultures en auto- et hétérotrophie les sources d'azote sont principalement minérales (NH₄⁺, NO₃⁻ et NO₂⁻) mais il existe également des sources organiques telles que l'urée et les acides aminés. Lors de l'assimilation des nitrates il y a augmentation du pH. Cette assimilation est très énergétivore pour la cellule et nécessite une consommation importante de protons. Les nitrates sont transportés dans les cellules puis ils sont réduits en nitrite par une nitrate réductase. Cette réaction utilise 2 électrons. Il existe un lien entre le métabolisme de l'azote et celui du carbone. En effet, les glucides sont des activateurs de la transcription des nitrates réductases.

Les nitrites sont réduits dans la cellule en ammonium par une nitrite réductase. Cette réaction nécessite 6 électrons et 8 protons ce qui conduit à l'augmentation du pH de la cellule. L'ammonium est associé à du cétoglutarate pour former du glutamate via l'activité de la glutamate déshydrogénase (enzyme présente dans les mitochondries et les chloroplastes). Il peut également être associé au glutamate pour générer de la glutamine après action de la glutamine synthétase. La glutamine et le glutamate peuvent ensuite être utilisés pour la biosynthèse d'acides aminés (transamination) et donc de structures protéiques.

La nature de la source d'azote influence la production et le métabolisme des microalgues. L'ammonium (NH₄⁺) et les acides aminés tel que la L-arginine sont les sources d'azote les plus assimilables par les microorganismes. La L-glutamine, les nitrates (NO₃⁻) et les nitrites (NO₂⁻) sont aussi des sources d'azote utilisables par la plupart des microalgues, contrairement à l'urée et à d'autres formes d'azote organique de nature non acide aminé (Perez-Garcia *et al.*,

Synthèse bibliographique

2011 ; Turner, 1970). Les microalgues *Scenedesmus* utilisent l'azote sous forme de nitrates de sodium et d'acétate d'ammonium, ce qui permet une croissance plus importante que l'urée et le carbonate d'ammonium pour lesquels la quantité de biomasse produite est divisée par 2,5 (Vidyashankar *et al.*, 2013). De même, en condition de concentrations optimales en nitrates (0,075 mM) ou ammonium (0,1 mM), c'est l'ammonium qui permet la meilleure production de biomasse (53,3 mg.L⁻¹ contre 34,8 mg.L⁻¹) pour la microalgue *Gyrodiniumim pudicum* (Yim *et al.*, 2003).

Comme indiqué précédemment, les métabolismes de l'azote et du carbone sont fortement liés. En présence d'azote, le flux de carbone (issu de la fixation du CO₂) est dirigé vers la glycolyse (au détriment de la synthèse de saccharose, d'amidon ou de lipides) pour permettre la production de précurseurs d'acides aminés (Morot-Gaudry, 1997). Par conséquent, lorsque le milieu de culture des microalgues est carencé en azote, la croissance des microalgues diminue. Elles entrent en phase stationnaire et accumulent des lipides (triacylglycérols) et/ou des glucides, au détriment des protéines et des pigments (Ho *et al.*, 2012 ; Da Silva *et al.*, 2009). Ce phénomène induit un accroissement du volume cellulaire (Da Silva *et al.*, 2009 ; Lamers *et al.*, 2012).

La carence en azote est responsable d'une modification quantitative et qualitative de la production de molécules par les microalgues. Ainsi, *Pseudochlorococcum sp.* et les microalgues appartenant au genre *Chlorella* accumulent des lipides neutres en réponse à un stress en substrat azoté (Li *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2012b).

Les microalgues du genre *Scenedesmus* soumises à une carence azotée augmentent leur teneur en lipides intracellulaires (de 11,5% à 22,4%) et en changent la composition. Cela se traduit par une augmentation de la teneur en acides gras saturés en C18 et C16 (acides stéarique et palmitique), en acides gras mono-insaturés en C18 (acide oléique) au détriment des acides gras polyinsaturés de type linoléique et linolénique (C18:2 et C18:3) (Ho *et al.*, 2012). La même modification du profil en acides gras constitutifs se retrouve chez *Dunaliella salina* (Lamers *et al.*, 2012) où les molécules insaturées telles que C16:1, C16:3, C16:4, et C18:3 diminuent en l'absence d'azote alors que les acides gras C16:0, C16:2, C18:0, C18:1, et C18:2 augmentent. Si le degré d'insaturation est exprimé en moyenne du nombre de doubles liaisons par molécule d'AG, il est de 2,2 en présence d'azote et il décroît à 1,8 après 35h de carence chez les TAG de la microalgue *Dunaliella* (Lamers *et al.*, 2012).

Synthèse bibliographique

Une carence azotée peut également se traduire par un changement de pigmentation des microalgues. A titre d'exemple, les algues du genre *Scenedesmus* deviennent brunes après 12 jours de carence en azote du fait d'une diminution de la teneur en chlorophylle (Vidyashankar *et al.*, 2013). La diminution des pigments en situation de carence azotée n'est pas immédiate car les microalgues adaptent leur métabolisme. Ainsi, d'après Da Silva *et al.*, (2009) les microalgues de l'espèce *Rhodomonas sp.* en situation de carence azotée ont une teneur en chlorophylle *a* constante alors que la chlorophylle *c* augmente fortement les premiers jours suivant la carence puis diminue pour revenir à la normale. En ce qui concerne les phycoérythrines, leur concentration augmente. Une fois que ces microalgues se sont adaptées aux conditions de carence en azote les concentrations en pigments chlorophylle *a*, *c* et phycoérythrines diminuent (de 50% pour les chlorophylles et de 90% pour la phycoérythrines à 6 jours de carence). Pour se protéger contre la carence en azote et conserver une source d'azote disponible les microalgues catabolisent leurs pigments constitutifs et notamment les pigments surnuméraires des antennes collectrices tels que la phycoérythrine. Ce phénomène entraîne un verdissement des cultures de microalgues rouges (Da Silva *et al.*, 2009). Cependant la concentration en certains pigments augmente lors d'une carence en azote. C'est le cas du bêta-carotène intracellulaire de la microalgue *Dunaliella salina* qui évolue de 1,28 g.L⁻¹ à 14,4 g.L⁻¹ de biomasse (en volume cellulaire) en situation de carence azotée (Lamers *et al.*, 2012). Le même phénomène a été décrit, chez *Eustigmatos cf. polyphem* pour qui la concentration intracellulaire en bêta-carotène augmente d'un facteur 3 suite à une carence azotée (Li *et al.*, 2012).

1.3.1.3. Le phosphore et le soufre

Le phosphore est un atome indispensable à la vie des organismes. Il participe à de nombreux processus métaboliques, notamment au travers des échanges d'énergie (ATP), dans la formation des acides nucléiques et des phospholipides (Prescott *et al.*, 2003). Le phosphore est peu répandu dans la nature. On le trouve principalement sous la forme de sels de phosphate (PO₄³⁻). Tout comme l'azote, une carence en phosphore entraîne une diminution de la croissance cellulaire.

La microalgue *Scenedesmus* voit son taux de croissance diminuer par un facteur deux en cas de carence en phosphate (Martinez Sancho *et al.*, 1997). Chez *Chlorella vulgaris*, la même carence entraîne une diminution spécifique de la quantité de polyphosphate inorganique intracellulaire (Hernandez *et al.*, 2006). L'affinité des microorganismes pour le substrat

Synthèse bibliographique

(phosphate) varie en fonction de l'espèce. Elle est de 1-6 μM pour les espèces appartenant au genre *Scenedesmus*, et de 4-5 μM pour le genre *Chlorella* (Martinez Sancho *et al.*, 1997). En conditions de limitation par le phosphore (de 1 à 0,1 mg.L^{-1}), la teneur en lipides de *Scenedesmus sp.* augmente d'un facteur 2. Cette augmentation de la teneur en lipides s'accompagne d'une diminution de la production de biomasse du même facteur (Xin *et al.*, 2011).

Le soufre est également important pour le développement des organismes. Il entre dans la composition de certains acides aminés, tels que la cystéine et la méthionine mais également dans la formation de coenzyme A, très impliqué dans le métabolisme énergétique. Il est utilisé par les organismes photosynthétiques principalement sous forme de sulfate (SO_4^{2-}) (Prescott *et al.*, 2003). Une carence en soufre entraîne une diminution de la croissance, d'un facteur 2 à 2,5 chez *Tetraselmis subcordiformis*, *Chlorella vulgaris* et *Chlorella sorokiniana*, et conduit à une augmentation des réserves d'amidon de façon temporaire (1,2 à 1,8 g.L^{-1} chez *T. subcordiformis*). Au-delà de sept jours, les réserves de glucides diminuent au profit d'une augmentation de la synthèse de lipides chez *Chlorella* (Mizuno *et al.*, 2013 ; Yao *et al.*, 2012).

1.3.1.4. Les sels et les microéléments

Du fait de leur capacité à s'adapter à une large gamme d'environnements, les microalgues sont en mesure de supporter des milieux aux propriétés physico-chimiques extrêmement variées. Ainsi certaines microalgues sont adaptées à l'eau douce (*Chlorella*, *Synura*, *Oscillatoria*...), d'autres aux milieux marins (*Rhodella*, *Porphyridium*...) et certaines sont halophiles (*Gyrodinium*, *Dunaliella*...). Les microalgues marines peuvent s'adapter à des milieux de concentrations en sel (NaCl) de 10% à 50% (m/v) en fonction de la microalgue. Au-delà de ces valeurs seuil, la croissance cellulaire est ralentie voire même stoppée (Turner, 1970 ; Eggert *et al.*, 2007). Lorsque la concentration en sel devient trop importante pour la microalgue marine, il se crée un stress osmotique qui induit des changements dans son métabolisme. L'excès de sel n'a pas d'effet létal sur les cellules de microalgues marines qui sont protégées grâce à des systèmes d'adaptations de la photosynthèse, de la production de glucides, de pigments et de lipides.

Les algues *Dunaliella viridis* augmentent l'expression d'un gène codant pour la sous unité 26S du protéasome (responsable de la dégradation des protéines) en réponse à l'augmentation de la salinité externe. Ce phénomène indique, selon Sun *et al.*, (2010a), que la tolérance à la

Synthèse bibliographique

salinité de *D. viridis* dépend de la capacité de la microalgue à dégrader ses protéines endommagées.

Les microalgues du genre *Scenedesmus* en conditions de stress salin (concentrations en NaCl de 50 à 100 mM), accumulent des lipides (triacylglycérols principalement saturés), des osmoprotecteurs tels que les polyols, ainsi que des caroténoïdes qui colorent les algues en brun. La morphologie de la microalgue est également modifiée et les cellules s'arrondissent. L'ensemble de cette adaptation se fait au détriment de la croissance cellulaire (Vidyashankar *et al.*, 2013). Chez *Dunaliella* l'augmentation de la quantité de sel entraîne un stress hyper-osmotique qui conduit à l'augmentation de glycérol intracellulaire. A contrario, un stress hypo-osmotique conduit à l'augmentation du catabolisme du glycérol (Goyal, 2007).

La teneur en bêta-carotène dans les cellules augmente d'un facteur 2 chez l'espèce *Dunaliella salina* soumise à un stress hyper-osmotique (NaCl 20% m/v) (Cowan *et al.*, 1995 ; Riyahi *et al.*, 2007). L'accroissement de la production de bêta-carotène serait la conséquence de l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (O_2 et H_2O_2) qui induiraient la transcription du gène de la biosynthèse du bêta-carotène (Phillips *et al.*, 1995).

Lors de stress osmotiques, *Bangiopsis subimplex* produit des polyols qui sont des osmolytes organiques qui équilibrent la pression osmotique de part et d'autre de la membrane cellulaire (Eggert *et al.*, 2007). De même, certaines microalgues et notamment les microalgues marines rouges (Rhodophytes) produisent un exopolysaccharide qui forme un mucilage autour des cellules en cas de stress osmotique. Cette capsule glucidique permet de limiter les échanges ioniques et de protéger les cellules (Turner, 1970).

Les différentes substances minérales présentes dans le milieu de culture des microalgues peuvent également stimuler ou inhiber la croissance des microalgues ainsi que leur métabolisme par un effet non lié à la pression osmotique. Cela peut être lié par exemple à l'apport de microéléments indispensables au fonctionnement de certaines métalloenzymes. Ainsi, le fer sous forme d'ions ferriques (sels de $FeCl_2 \cdot 6H_2O$) stimule la croissance cellulaire de *Gyrodinium impudicum* (Yim *et al.*, 2003). Selon Lin *et al.*, (2012a) l'augmentation de la quantité d'ions ferriques permet une augmentation de l'absorption d'azote qui serait responsable de l'amélioration de la croissance cellulaire de *Scenedesmus rubescens*. A contrario, la présence de microéléments en excès peut réduire la vitesse de croissance. C'est le cas par exemple, pour l'espèce *Chlorella reinhardtii* pour laquelle on assiste à une inhibition de l'assimilation des nitrates en présence de concentrations en certains ions métalliques

Synthèse bibliographique

(cadmium, cuivre ou zinc) supérieures à 100 μM . Ce phénomène est lié à une inhibition de l'activité de la glutamate synthétase (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Les microéléments tels que la vitamine B12 (cyanocobalamine) peuvent avoir un effet positif sur la croissance cellulaire de certaines microalgues telles que *Gyrodinium impudicum* (Yim *et al.*, 2003) et aucun effet sur d'autres telles que *Rhodella maculata* (Evans, 1970).

1.3.2. Effets des conditions d'irradiance et de l'environnement physico-chimique

L'environnement physico-chimique dans lequel se trouve la microalgue influence fortement sa croissance et son métabolisme et donc impacte directement les rendements de production de biomasse et/ou de production de biomolécules. Dans la littérature, le pH, la température et l'irradiance sont les principaux paramètres décrits.

1.3.2.1. L'irradiance

La photosynthèse est un mécanisme lumière-dépendant qui détermine la croissance et le métabolisme des microalgues en autotrophie. En l'absence de source lumineuse, la photosynthèse cesse de fonctionner et les cellules entrent en phase de respiration. Les microalgues consomment leurs réserves énergétiques en l'absence d'apport d'une source de carbone organique. Le passage de la photosynthèse à la respiration dépend de l'irradiance. La respiration commence lorsque les cellules n'ont plus assez de lumière pour réaliser la photosynthèse. Par conséquent, pendant la période lumineuse, la respiration et la photosynthèse se déroulent simultanément. La production d'oxygène correspond au résultat de la différence entre la photosynthèse réelle et la respiration (Figure 14).

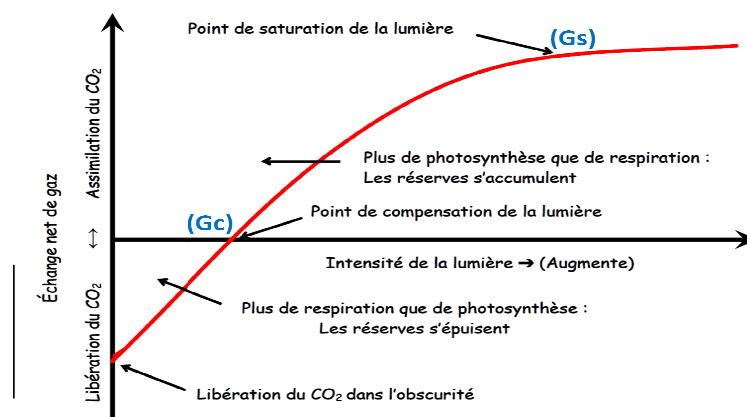


Figure 14 Respiration et photosynthèse chez les végétaux en fonction de l'irradiance (Tousignant et Delorme, 2006).

Synthèse bibliographique

Plus la lumière est intense plus la croissance cellulaire augmente. Ceci reste vrai jusqu'à un certain seuil d'irradiance noté G_s . Au-delà de ce seuil, qualifié d'irradiance de saturation (G_s), les cellules restent viables mais ne se multiplient plus. On parlera de photoinhibition (Ritz *et al.*, 2000 ; Evans et Maureen, 1974). Cette valeur seuil est spécifique à chaque espèce de microalgue en fonction de la niche écologique qu'elle occupe. Par conséquent, une production de microalgues peut se décrire au travers de l'irradiance optimale utilisée. On distingue le point de compensation (G_c) où la photosynthèse compense juste la respiration, une phase de limitation où la quantité de lumière n'est pas assez importante pour permettre une photosynthèse optimale ($G < G_s$) ; une phase de saturation où la photosynthèse est maximale (G_s) ; et une phase d'inhibition où la lumière est trop forte et entraîne un stress ($G > G_s$) (Figure 14).

Pour *Pseudochlorococcum sp.*, la photoinhibition débute pour des irradiances supérieures à $300 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Lors de la photoinhibition, ces microalgues accumulent des lipides neutres et des glucides (amidon) (Li *et al.*, 2011). Pour des radiations inférieures à $180 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, *Scenedesmus obliquus* entre en phase de limitation et la plus forte croissance est obtenue pour des radiations entre 180 et $540 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (phase de saturation avec un G_s à $420 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Au-delà de $540 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ il y a inhibition de la croissance de *Scenedesmus* (Ho *et al.*, 2012).

Les compositions quantitative et qualitative en pigments photosynthétiques varient avec l'irradiance, notamment pour les microalgues possédant un phycobilisome (algues bleues et rouges). Pour ces microalgues on assiste à une diminution importante des phycobilines dans les cellules en présence de lumière de fortes longueurs d'ondes (rouge de 600-700 nm) et pour des irradiances importantes (Rahaoui, 1999 ; Marquardt et Rehm, 1995 ; Akimoto *et al.*, 2012). Ce phénomène suggère une adaptation du système photosynthétique aux conditions environnementales de culture. La lumière rouge (600-700 nm), surtout sous faible irradiance, permet, par rapport à la lumière blanche, de diminuer la quantité de phycoérythrines et d'augmenter celles des phycocyanines et des allophycocyanines. Pour une lumière blanche ou verte les quantités de pigments surnuméraires sont les mêmes puisque les phycobiliprotéines absorbent principalement les longueurs d'ondes situées dans le vert (Mihova *et al.*, 1996).

A contrario, il existe des microalgues qui tolèrent de fortes intensités lumineuses comme certaines espèces de *Chlorella*. A titre d'exemple, *C. sorokiniana* peut se développer sous des irradiances de $2\,500 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Lorsque la microalgue est en présence de fortes

Synthèse bibliographique

intensités lumineuse, on assiste à une augmentation de la quantité de chlorophylles *a* et *b* et de certains caroténoïdes xanthophylles (zéaxanthine et violaxanthine). Les xanthophylles contribuent à la survie de la microalgue en stress lumineux en dissipant l'excès d'énergie absorbée (De Bashan *et al.*, 2008). L'irradiance a également des effets sur l'assimilation des substrats. Ainsi, une augmentation de l'irradiance permet d'augmenter la vitesse d'assimilation du nitrate par la grande majorité des microalgues mais n'a aucun effet sur l'assimilation de l'azote organique, qui peut donc avoir lieu à l'obscurité (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Le cycle d'éclairage utilisé a aussi un impact sur l'activité photosynthétique et donc sur le métabolisme des microalgues. Plus la phase d'éclairage est longue (cycle éclairage/obscurité d'au minimum 12/12 ou 18/6) plus les rendements en biomasse et l'accumulation de lipides sont importants (Reboloso Fuentes *et al.*, 2000). En fonction de la phase dans laquelle se trouvent les algues, les mécanismes mis en jeu sont différents. La production de glucides est plus importante en présence de lumière et elle servira comme molécule de stockage d'énergie en absence de lumière (respiration).

Selon Meseck *et al.*, (2005), il existe une relation entre la durée d'éclairage et l'intensité lumineuse. En effet, les microalgues doivent être exposées à un nombre minimum de photons par jours pour se développer de façon optimale. Par conséquent, plus faible est la quantité d'éclairage plus longue doit être la durée de la phase lumineuse. C'est le cas pour les microalgues *Nannochloropsis sp.* où la croissance cellulaire et la production de lipides sont optimales pour un cycle 18/6 sous une irradiance de $100 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ qui conduit à l'obtention d'une densité finale de $6,5 \cdot 10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$ (Wahidin *et al.*, 2013).

La durée d'éclairage par jour est également un facteur important pour la conduite de culture de microalgues. L'effet de la photopériode dépend de l'irradiance à laquelle est soumise la culture. Sous une irradiance inférieure à l'irradiance optimale de croissance (G_s) une augmentation de la durée d'éclairage permet d'améliorer le développement des microalgues. Pour des irradiances plus importantes lorsque le phénomène de photoinhibition intervient et entraîne une diminution de la croissance, une diminution du cycle d'éclairage engendre une diminution des effets de l'inhibition. Ainsi le cycle d'éclairage a des effets plus importants chez *Nannochloropsis sp.* cultivée à 50 ou $200 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ comparé à un éclairage optimal de $100 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou le taux de croissance est équivalent pour des cycles 24/0 et 18/6 (Wahidin *et al.*, 2013).

1.3.2.2. Température et pH

La température est un facteur qui intervient dans le développement et la croissance cellulaire des microalgues. Les microalgues n'ont pas toutes le même comportement vis à vis de la température. Elles peuvent être cryophiles, mésophiles ou encore thermotolérantes.

Les microalgues cryophiles se développent à des températures de l'ordre de 4 à 5°C comme c'est le cas pour les microalgues appartenant au genre *Dunaliella* qui se développent dans des lacs hypersalins de l'Antarctique (Xu *et al.*, 1998). Les microalgues mésophiles se multiplient à des températures comprises entre 15 et 35°C. Ce sont les microalgues les plus abondantes en termes de diversité de genres et d'espèces (*Porphyridium*, *Tetraselmis*, *Chlorella*...). La microalgue *Celastrella sp.* est thermotolérante et peut se développer à des températures supérieures à 35°C. Elle accumule des pigments (astaxanthine, lutéine, canthaxanthine et bêta-carotène), des triglycérides, et se développe à des températures allant jusqu'à 50°C avec un optimum de croissance à 45°C (Hua *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2012a).

La température de culture des microalgues influence leurs métabolismes et donc la production de molécules. Les différentes espèces d'algues n'ont pas une sensibilité équivalente aux changements de températures. Ainsi, les microalgues de l'espèce *Scenedesmus sp.*, une microalgue mésophile, sont en mesure de s'adapter à des changements de température de leur milieu de culture. Selon Xin *et al.*, (2011) les courbes de croissance de *Scenedesmus* sont parallèles lors de la phase de croissance puis elles se superposent en phase stationnaire pour des températures de 20, 25 et 30°C, avec une biomasse moyenne de $8,47 \cdot 10^6 (\pm 0,55)$ cellules.mL⁻¹. Pour des cultures à 10°C la microalgue a besoin d'un temps d'adaptation de trois jours avant de croître de la même manière qu'aux autres températures. Au final, la biomasse produite est similaire pour les quatre conditions de température. Cependant le taux de croissance est plus important à 25°C (0,8 j⁻¹). Les microalgues de l'espèce *Chlorella vulgaris* qui ont une croissance optimale entre 25 et 30°C s'adaptent également aux changements de température mais sont incapables de se développer au-delà de 38°C. Par opposition, *Nannochloropsis oculata*, qui présente une croissance optimale à 20 °C est plus sensible aux changements de température avec une croissance divisée par deux à 15 et 25°C (Converti *et al.*, 2009).

La température a également des effets sur la production de lipides par les microalgues. D'après Xin *et al.*, (2011), *Scenedesmus* a une production de lipides pour des températures de

Synthèse bibliographique

10 et 20°C qui est supérieure de 34 % à celle observée à 25°C (température optimale de croissance) et 30°C. Le même phénomène est observé pour *Nannochloropsis oculata* qui produit deux fois plus de lipides à 15°C et 25°C qu'à 20°C (température optimale de croissance) (Converti *et al.*, 2009). A l'opposé, les souches du genre *Chlorella* ont une production optimale de lipides pour des températures élevées 30-35°C (Converti *et al.*, 2009 ; Han *et al.*, 2013).

La variation de la composition en lipides des microalgues, surtout au niveau des membranes, est indispensable pour leur adaptation aux changements de température de culture, et le mécanisme d'adaptation est différent selon la microalgue.

De même que pour la température, il existe différents comportements métaboliques et physiologiques de microalgues, face au pH de leur milieu de culture. La plupart des microalgues sont alcalophiles et se développent dans des milieux de culture de pH compris entre 7 et 10,5. Ainsi, les microalgues du genre *Scenedesmus* peuvent survivre à des variations de pH allant de 5 à 11 mais montrent un optimum de développement pour un pH compris entre 9 et 11. A noter que pour ces pH fortement basiques, on assiste à un phénomène d'autoflocculation (formation d'agrégat par les cellules) qui n'interfère pas avec la croissance des microalgues. Le pH n'a pas d'influence notable sur la composition et la production de métabolites tels que les lipides. (Vidyashankar *et al.*, 2013). A l'opposé, il existe des algues qui se développent à pH acide. Ainsi, *Chlamydomonas acidophila* est une microalgue acidophile qui pousse à des pH compris entre 2 et 9 avec un optimal de croissance pour un pH de 6 (Cuasmas *et al.*, 2006).

1.3.3. Conditions de culture des microalgues marines rouges

Les microalgues rouges marines peuvent se développer en profondeur jusqu'à 250 m grâce à leur composition en pigments. Elles sont capables de s'adapter à une large gamme de spectres de lumière et de salinité. Néanmoins, le changement de conditions de culture doit être progressif afin d'éviter tous chocs ou stress qui pourraient endommager le métabolisme cellulaire. Les conditions de culture optimales pour la croissance des Rhodophytes (*Rhodella*, *Porphyridium* et *Dixonella*) sont équivalentes. Elles se développent sous des températures comprises entre 20 et 27°C, avec une photopériode (jour/nuit) de 24/0, 16/8, et 12/12 ; sous des intensités de lumière comprises entre 27 et 500 $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, un pH compris entre 7,6 et 8 et pour des teneurs en CO_2 de 1 à 3% (Mihova *et al.*, 1996 ; Nuutila *et al.*, 1997 ; Fabregas *et al.*, 1999 ; Rahaoui, 1999 ; Klein *et al.*, 2012).

Synthèse bibliographique

Les microalgues rouges se cultivent dans différents milieux mimant leur environnement tels que des milieux d'eaux de mer artificielles enrichies. Les principaux milieux de cultures utilisés (indifféremment du genre) sont : le milieu Hemerick (Hemerick, 1973), le milieu f/2 (Guillard et Ryther 1962), et le milieu Provasoli modifié (West et McBride, 1999).

Une carence en azote provoque le verdissement des cultures de microalgues rouges. Ce changement de couleur est dû à la disparition progressive des pigments surnuméraires. En effet, les phycobilisomes sont constitués d'une partie protéique qui est détruite au profit de la synthèse d'autres protéines indispensables à la survie de l'algue. L'ajout d'azote dans le milieu permet de repigmenter les microalgues (Rahaoui, 1999). La composition en pigments est également modifiée par la qualité et l'intensité de la lumière utilisée pour la culture. Les phycobilines sont les pigments surnuméraires principaux des microalgues rouges et la phycoérythrine est le pigment dominant (Reboloso Fuentes *et al.*, 2000). Mihova *et al.*, (1996) ont observé les trois phycobilines de la microalgue *Rhodella reticulata* sous des lumières verte, rouge et blanche de trois intensités (18, 90 et 215 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la teneur en pigments surnuméraires avec la diminution de l'intensité lumineuse sous toutes les radiations testées. Reboloso Fuentes *et al.*, (2000) ont observé le même phénomène, chez la microalgue *Porphyridium cruentum* cultivée sous lumière blanche. Par ailleurs, selon Mihova *et al.*, (1996), sous les lumières blanche et verte, les microalgues rouges (*R. reticulata*) ont des teneurs en pigments surnuméraires équivalentes, alors qu'une adaptation chromatique est observée sous lumière rouge. Ces pigments absorbent préférentiellement les longueurs d'ondes vertes (500-578 nm). Lorsque les algues sont soumises à des radiations rouges sous faible irradiance (600-700 nm, irradiance 18 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), la teneur en pigments surnuméraires totale augmente en passant de 11,3 à 14,5% (m/m) de la biomasse sèche avec un doublement de la quantité de phycocyanine (pigment absorbant dans l'orange : 580-620 nm) et une diminution de la phycoérythrine de 4,5% à 3,6% (pigment absorbant dans le bleu-vert, 460-560 nm). La croissance cellulaire est maximale pour une lumière rouge (600-700 nm) et minimale pour une lumière verte (500-578 nm). En revanche, la quantité des allophycocyanines ne varie pas avec la qualité de la lumière.

La culture hétérotrophe de microalgues rouges est également possible et décrite dans la littérature. Comme pour les autres microalgues, la principale contrainte est d'arriver à obtenir des cultures axéniques. Des cultures axéniques de *Porphyridium cruentum* peuvent être réalisées dans l'obscurité avec du glucose comme source de carbone et de l'azote sous forme

Synthèse bibliographique

de nitrate de sodium. Dans ces conditions de cultures les microalgues stockent des lipides. La production de lipides par *P. cruentum* peut également être favorisée en modulant son cycle jour/nuit. En effet, le cycle jour/nuit influence fortement la croissance cellulaire et donc la production de molécules par les microalgues. Selon Oh *et al.*, (2009) la plus forte accumulation de lipides par *P. cruentum* est de 19,3% (m/m) en cycles 12 :12.

Il existe deux méthodes principales de culture des microalgues à grande échelle : les étangs (ou bassins) ouverts à écoulement continu (« open raceway ponds » ou « champs de course ») (Figure 15) ou les systèmes fermés qualifiés de photobioréacteurs.



Figure 15 Etang en raceway Sandia National Laboratories USA (Photo courtesy RFE. Renewable Fuel &Energy B.V.)

Les étangs ouverts sont un système de culture utilisant des étangs ou des lacs avec un équipement mécanique. C'est la première technologie pour la culture de masse de microalgues. Dans ce système, les algues sont cultivées dans des conditions identiques à leur milieu naturel et les niveaux d'eau sont maintenus à des profondeurs de 0,2 à 0,5 m afin que les microalgues aient une exposition suffisante à la lumière naturelle. Le bassin est conçu dans une configuration de « chemin de roulement » ou en cercle, dans laquelle une roue à aubes permet la circulation et le mélange des microalgues et des éléments nutritifs. Le CO₂ est apporté par bullage (Figure 16). Les étangs sont principalement construits en béton ou en plastique. La taille varie du petit modèle expérimental (1,4 m³) au très gros volume industriel (4 000 m³).

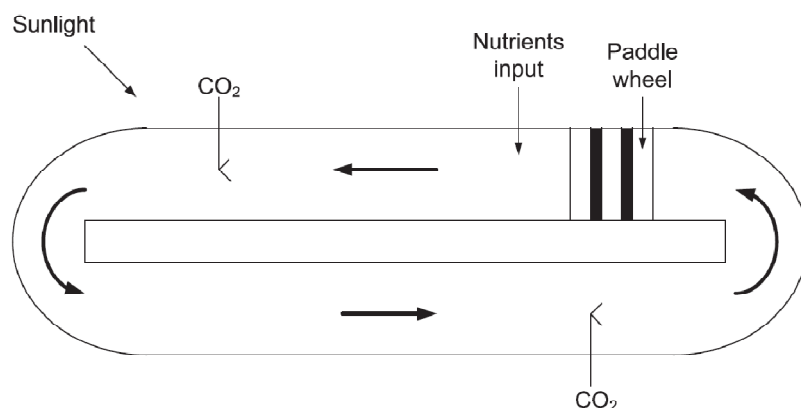


Figure 16 Schéma d'un étang ouvert en raceway (champs de course) utilisé pour la culture de microalgues (Lam et Lee, 2011).

Pour les systèmes ouverts, il existe des phénomènes de stress et de photoinhibition induit par l'irradiance solaire importante qui n'est pas contrôlée. La plupart des microalgues rouges étant des organismes d'eau profonde, elles sont de ce fait, difficilement cultivables avec cette technologie. Ce système de production est également sujet à des contaminations par des espèces locales, ou encore des organismes algophage (daphnies, copépode) (Cadoret et Bernard, 2008). Les étangs de culture sont plus couramment utilisés pour la culture de microalgues extrémophiles dont beaucoup de microalgues vertes (Harun *et al.*, 2010). En effet, ces microalgues étant souvent capables de se développer dans des milieux très alcalins (*Arthrospira platensis*), et/ou hypersalins (*Dunaliella salina*) ou encore à des pH très acides, elles sont de fait à l'abri des contaminants microbiens (Lee, 2001).

Pour éviter les contaminations, le photobioréacteur est un meilleur outil de culture, surtout dans le cas des microalgues marines rouges. Le photobioréacteur est un bioréacteur doté d'une source lumineuse permettant la culture de microorganismes photosynthétiques en suspension dans l'eau ainsi qu'un contrôle et un ajustement des paramètres de culture. La culture en réacteur permet notamment d'augmenter la vitesse de croissance et d'orienter les cultures pour la production de molécules d'intérêts en jouant notamment sur l'irradiance (contrôle de la photoinhibition) et en limitant les contaminations microbiennes.

Au cours de la croissance cellulaire en photobioréacteur, la densité de cellules augmente et entraîne l'apparition d'une zone sombre d'importance croissante au cours de la culture (Huang *et al.*, 2012b). Cette zone sombre provoque un ralentissement de l'activité photosynthétique, une augmentation de la respiration et donc un ralentissement de la croissance. Cet effet varie en fonction du type de photobioréacteur utilisé. Il peut être

Synthèse bibliographique

partiellement contrôlé par l'augmentation de l'irradiance et de l'agitation. Il existe différents types de photobioréacteurs. Le photobioréacteur tubulaire vertical, le photobioréacteur tubulaire horizontal, le photobioréacteur plat, le photobioréacteur hélicoïdal, le photobioréacteur en cuve agitée et le photobioréacteur hybride (Figure 17).

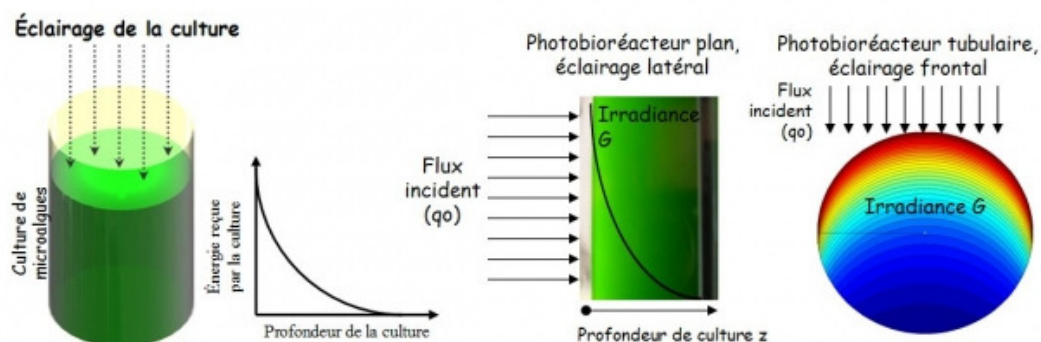


Figure 17 Transfert de rayonnement au sein de photobioréacteurs (image Jérémy Pruvost GEPEA).

1.4. Molécules d'intérêts produites par les microalgues

L'intérêt majeur de la culture de microalgues est la production de molécules à hautes valeurs ajoutées. Les microalgues sont une source importante de lipides, de protéines, de polysaccharides et de pigments.

1.4.1. Les lipides

Les lipides sont des constituants indispensables des cellules de microalgues. On les retrouve au niveau structural (phospholipides constitutif des membranes) et énergétique (molécules de réserve). Globalement, les microalgues peuvent être composées de lipides à hauteur de 16 à 75% de leur masse sèche en fonction des espèces (Harun *et al.*, 2010). Les microalgues stockent les lipides sous forme de triacylglycérols (ou triglycérides). Les triacylglycérols sont composés de trois molécules d'acide gras et d'un glycérol. Les microalgues contiennent une grande variété d'acides gras, dont la composition varie en fonction des espèces. Ainsi il existe des microalgues oléagineuses ayant de fortes teneurs en lipides telles que *Pseudochlorococcum sp.* (Chlorophyceae) (Li *et al.*, 2011) ou *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmaphyceae) (Wan *et al.*, 2013) qui peuvent accumuler des lipides à hauteur de respectivement 52% et 65%.

Les microalgues produisent des acides gras spécifiques qui peuvent trouver différentes utilisations (agroalimentaire, pharmaceutique, bioraffinerie...). Les lipides sont principalement

Synthèse bibliographique

utilisés pour la fabrication de biocarburants. Les microalgues produisent des lipides neutres faiblement insaturés qui sont donc propices à la formation de biodiesel (Harun *et al.*, 2010). Dans le cas de *Nannochloropsis oceanica*, les principaux acides gras identifiés ont été l'acide hexadecadiénoïque (C16:2), l'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1) avec 65% de lipides saturés et 26-33% de mono-insaturés. Même si toutes les microalgues produisent majoritairement des triacylglycérols qui contiennent des acides gras en C16 et C18, il est possible de trouver des compositions variables en fonction des espèces et des conditions de culture. Ainsi, les microalgues vertes de l'espèce *Chlorella vulgaris* accumulent des C18:1, C18:2 (acide linoléique), et des C18:3 (acide linoléique) (Pignolet *et al.*, 2013) tandis que les C16:0, C18:1 et C18:2 sont les principaux acides gras produits par les microalgues appartenant au genre *Scenedesmus* (Ho *et al.*, 2012, Vidyashankar *et al.*, 2013).

Les microalgues sont aussi des producteurs d'oméga-3 qui peuvent être extraits et utilisés comme complément alimentaire pour l'Homme. Les microalgues synthétisent également des acides arachidonique et eicosapentaénoïque (EPA) et linoléique. L'EPA et l'acide arachidonique peuvent moduler le métabolisme humain. L'acide arachidonique est un composant des membranes phospholipidiques et est précurseur des prostaglandines, alors que l'EPA est précurseur des eicosanoïdes (Rebellos Fuentes *et al.*, 2000). D'autre part, les acides gras insaturés de certaines microalgues comme ceux produits par les microalgues du genre *Nitzschia* limitent la formation de molécules pathogéniques (produit final de glycation avancée) responsable de complications dans le diabète. La consommation de ces microalgues est bénéfique pour les rats diabétiques (Sun *et al.*, 2010b).

L'environnement et les conditions de cultures impactent la composition et la teneur en lipides des microalgues. Chez *Scenedesmus*, les triacylglycérols diminuent avec la température. A des températures moyennes (20-25°C) le degré d'insaturation des acides gras est plus faible et les acides gras sont à 60-70% à chaînes longues (C22 : acide docosanoïque), acides gras qui sont absents pour les autres températures (10-30°C). A 10°C les lipides contiennent une majorité de C18:3 (linoléique) (+ de 80%), à 30°C ils possèdent 50% de C18:1, (n-9) (acide oléique). Les C18:2, (n-7) (acide linoléique) sont présents à toutes les températures (10°C, 20°C, 25°C et 30°C). Chez les espèces appartenant aux genres *Chlorella* et *Scenedesmus* les températures supérieures à la température optimale de croissance permettent une augmentation des C16 et une diminution des C18 (Xin *et al.*, 2011 ; Han *et al.*, 2013).

Synthèse bibliographique

1.4.2. Les protéines

Les microalgues produisent une quantité non négligeable de protéines à hauteur de 6 à 71% de leur masse sèche en fonction des espèces (Becker, 2007). A titre d'exemple, *Chlorella vulgaris* accumule jusqu'à 46% de protéines et *Arthrospira platensis* 70% (Pignolet *et al.*, 2013). Les protéines issues des microalgues constituent donc une fraction importante de la biomasse et elles sont une source importante d'acides aminés dont des acides aminés essentiels (Pignolet *et al.*, 2013). Les protéines produites par *Arthrospira platensis* sont à plus de 90 % digestibles et elles contiennent 60 % d'acides aminés essentiels (Dillon et Phan, 1993). Chez *Scenedesmus obliquus*, 30 à 45 % des acides aminés totaux sont des acides aminés essentiels (Becker, 2007).

La production de protéines par les microalgues diminue logiquement lors de carences en azote. Elle est maximale lorsque les microalgues sont en phase exponentielle de croissance (Ho *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013). La part de protéines est généralement sous-évaluée par rapport aux produits secondaires tels que les acides gras insaturés ou les pigments, pour des applications médicales, pharmaceutiques et nutraceutiques. Aujourd'hui, il n'existe toujours pas de demandes importantes d'extraits de protéines de microalgues purifiées car la présence de composants non protéiques conduit généralement à des changements indésirables dans la couleur ou le goût des protéines. Néanmoins, les efforts se tournent maintenant vers le potentiel génétique impressionnant des microalgues d'une part, et les activités spécifiques des protéines de microalgues d'autre part. Certaines biomasses algales sont cependant déjà utilisées comme compléments dans l'alimentation humaine et animale (aquaculture) en raison de leur haute teneur en protéines (Harun *et al.*, 2010).

1.4.3. Les pigments et les antioxydants

Les microalgues produisent des pigments qui sont indispensables à la photosynthèse. Elles possèdent toutes de la chlorophylle et des caroténoïdes (Figure 18) en quantités variables et certaines produisent des phycobilines. Les pigments sont des molécules complexes (cf 1.1.3.1.), qui ont la capacité de changer la couleur de la lumière réfléchiée ou transmise en fonction de l'absorption de longueurs d'onde spécifiques. Les microalgues bleues et rouges contiennent des phycobilines comme la phycoérythrine et la phycocyanine qui sont liées de façon covalente à des protéines spécifiques pour former les phycobiliprotéines constitutives du phycobilisome. Les caroténoïdes peuvent être violets, jaunes ou rouges. Ce sont des molécules liposolubles dont la structure de base est un enchaînement de huit unités

Synthèse bibliographique

isopréniques (2-méthyl 1,3-butadiène) possédant de nombreuses doubles liaisons conjuguées responsables de leur coloration. La majorité des caroténoïdes possèdent des cycles à l'une ou aux deux extrémités.

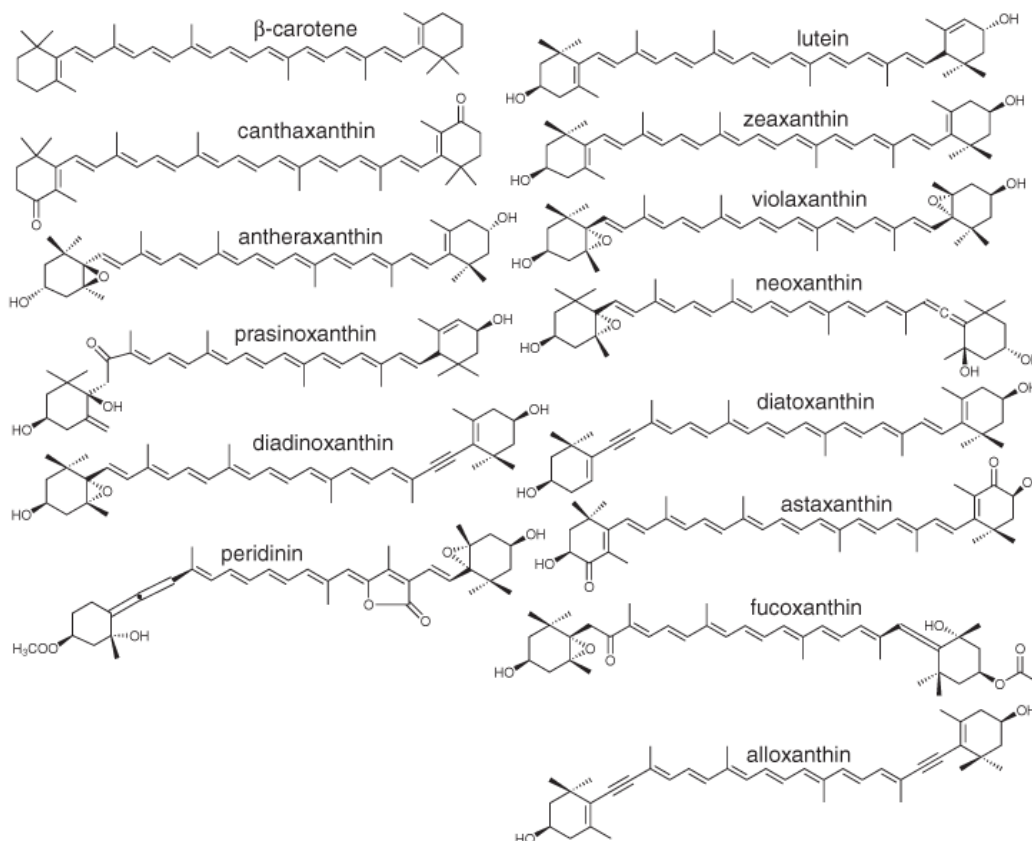


Figure 18 Structure des principaux caroténoïdes de microalgues (Guaratini *et al.*, 2009)

L'accumulation de caroténoïdes secondaires est généralement considérée comme une stratégie de survie employée par les algues en situation de stress photo-oxydatif ou d'autres conditions environnementales défavorables (Hu *et al.*, 2008). Les plus importants sont le bêta-carotène et la lutéine jaune de couleur rouge-orange. Les xanthophylles et phycobilines sont des composés de grande valeur pour les applications industrielles. Les microalgues eucaryotes *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* sont des organismes producteurs de pigments (Pignolet *et al.*, 2013). Les microalgues acidophiles de l'espèce *Chlamydomonas acidophila* accumulent aussi des caroténoïdes de type bêta-carotène, lutéine, zéaxanthine et violaxanthine (Cuaresma *et al.*, 2006).

Les pigments tels que les caroténoïdes (orange-rose) et les phycoérythrines (rouge) sont utilisés comme colorants en cosmétique et en industries agro-alimentaires (Rebellos Fuentes *et al.*, 2000). Ils peuvent également être utilisés pour leur fluorescence, dans les immunotests diagnostiques (Mihova *et al.*, 1966). Les pigments ont aussi des

Synthèse bibliographique

activités biologiques. Par exemple la chlorophylle, qui est un agent chélatant, peut être utilisée comme traitement dans les ulcères pour la régénération des tissus du foie (Harun *et al.*, 2010).

Les microalgues sont exposées à des stress oxydatifs et doivent donc produire des antioxydants. L'assimilation de l'oxygène par les organismes peut entraîner la formation de dérivés dangereux parmi lesquels l'oxygène singulet et les radicaux libres qui provoquent des dommages cellulaires. Ces formes très réactives ont un rôle important dans diverses pathologies chroniques (cancer, athérosclérose, arthrose, Parkinson...) ou aiguës (inflammation, choc septique...) (Klein *et al.*, 2012). Les antioxydants sont des composés capables de réduire les radicaux libres et de prévenir l'oxydation de molécules sensibles à l'oxydation tels que les lipides ou les acides aminés. Le coenzyme Q10 (Figure 19), l'alpha-tocophérol (Figure 20), l'ubiquinone ou la plastoquinone sont des molécules présentes chez les microalgues et ayant un pouvoir antioxydant (Mallick et Mohn, 2000).

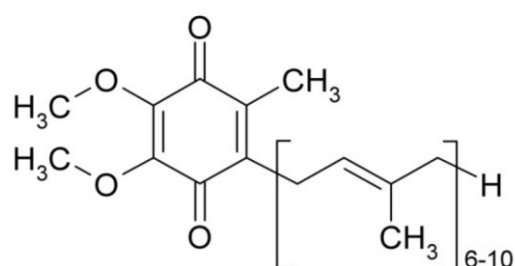


Figure 19 Structure du Coenzyme Q10

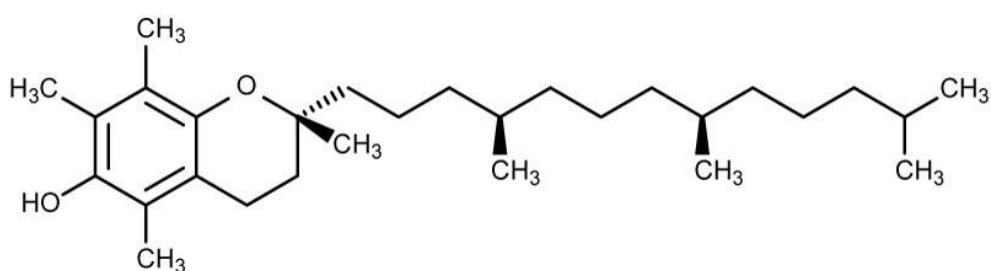


Figure 20 Structure de l'alpha-tocophérol

Les superoxydes dismutases (SOD), qui sont des enzymes anti-radicalaires, sont également abondantes chez certaines microalgues telles que les porphyridiales. Ces enzymes présentent un double intérêt comme traitement dans les pathologies accompagnées d'une forte augmentation de radicaux libres (notion de thérapies antioxydantes) et en cosmétique dans l'élaboration de soins anti-âge (Mallick et Mohn, 2000).

1.4.4. Les polysaccharides

1.4.4.1. Généralités

Les saccharides ou glucides sont les macronutriments les plus répandus dans la matière vivante et la majeure partie d'entre eux est produite lors de la photosynthèse. Ils représentent 5% de la masse sèche des animaux et jusqu'à 70% de celle des végétaux. Les glucides sont composés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène selon la formule $C_n(H_2O)_n$. Les glucides simples ou monosaccharides sont l'unité de base des saccharides. Ils sont porteurs d'au moins trois carbones (trioses), de deux fonctions alcools (OH), d'une fonction carbonyle (fonction aldéhyde (-CHO) ou cétone (-C=O)), et parfois d'une fonction amine (-NH₂) ou carboxylique (-COOH). Les monosaccharides peuvent être reliés entre eux par des liaisons O-glycosidiques et le nombre d'unités constitutives permet de déterminer le degré de polymérisation de ces polymères afin de les classer en deux catégories : les oligosaccharides composés de 2 à 10 monosaccharides et les polysaccharides constitués de plus de 10 monosaccharides. Les saccharides sont soit des holosides composés uniquement d'oses, soit des hétérosides composés d'oses et d'une partie non osidique dite aglycone. Les différents types de monosaccharides et de liaisons formées entre les unités principales permettent une grande variation de structure. La liaison osidique qui résulte d'une réaction de condensation entre deux oses, peut se faire entre l'hydroxyle porté par le carbone anomérique d'un ose et n'importe lequel des groupements hydroxyles d'un autre monosaccharide entraînant la formation d'une large gamme de macromolécules linéaires ou ramifiées. Tous ces paramètres participent à la diversité des polysaccharides qui peut encore être augmentée par la substitution des hydroxyles par des groupements non sucres de faibles tailles.

Les polysaccharides sont des molécules de haute masse molaire pouvant atteindre plusieurs millions de g.mol⁻¹. Les saccharides peuvent avoir plusieurs fonctions cellulaires. Ils peuvent jouer le rôle de molécules de réserve pour le stockage de l'énergie (amidon et glycogène) par les cellules. Ils peuvent faire partie intégrante d'autres familles moléculaires et avoir un rôle important dans le stockage de l'information et la communication cellulaire. C'est le cas des acides nucléiques (polyriboses et polydesoxyriboses), des glycosylations de protéines (glycoprotéines) ou de lipides (lipopolysaccharides), des glycosaminoglycanes (héparine, acide chondroïtique, hyaluronane,...). Ils peuvent également avoir un rôle dans le maintien et la résistance des tissus ou des cellules. Dans ce dernier cas, on peut citer certains mucopolysaccharides, la cellulose, la chitine ou encore le peptidoglycane.

1.4.4.2. Les polysaccharides de microalgues

Au même titre que les autres cellules végétales, les microalgues produisent différents types de polysaccharides. Ainsi, les microalgues produisent en fonction des espèces, des polysaccharides de structure également qualifiés de polysaccharides fibrillaires qui participent à la formation de la paroi des cellules, des polysaccharides de réserve énergétique et des exopolysaccharides qui forment un mucilage autour des microalgues rouges et encapsulent les cellules.

Les polysaccharides fibrillaires

La phase fibrillaire est généralement de nature cellulosique et/ou hémicellulosique (Figure 21). Ce sont des polymères de glucoses liés en β -(1,4) ou β -(1,3), et dans certaines espèces de xylose ou de mannose (Kornprobst, 2005).

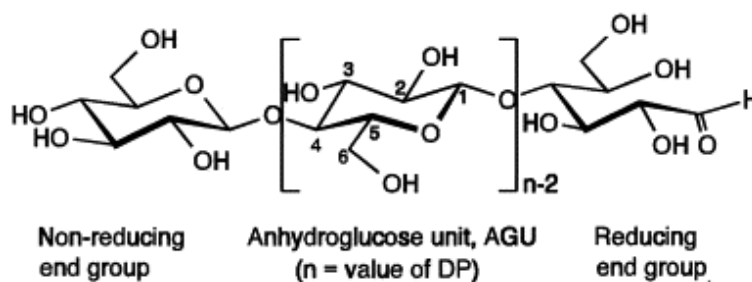


Figure 21 Structure de la cellulose (Heinze et Liebert, 2001)

Le polysaccharide fibrillaire de *Chlorella vulgaris* est un β -(1,3)-glucane avec une potentielle activité antitumorale, et immunostimulant (Pignolet *et al.* 2013).

Les polysaccharides de réserve

Le polysaccharide de réserve des microalgues est l'amidon. L'amidon est constitué d'amylose et d'amylopectine (Figure 22). L'amylopectine est le constituant majeur de l'amidon (70 à 80%). C'est un polymère de glucose lié en α -(1,4) et ramifié toutes les 12 unités en α -(1,6). L'amylose constitue les 20 à 30% de l'amidon restant. C'est un glucane linéaire lié en α -(1,4).

Synthèse bibliographique

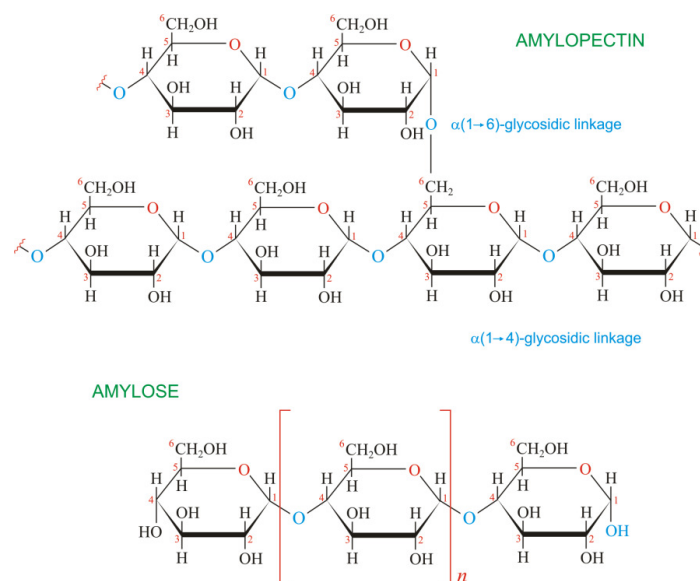


Figure 22 Structures de l'amylose et de l'amylopectine [4].

Chez les microalgues, le degré de polymérisation de l'amidon est variable et sa localisation cellulaire varie en fonction de la Division de l'algue. L'amidon est dit floridéen chez les microalgues lorsqu'il est présent sous forme de grain dans le cytoplasme (chez les Rhodophytes), alors qu'il est intraplastidial chez les algues vertes (comme chez les végétaux supérieurs).

Les microalgues accumulent de l'amidon afin de constituer une réserve de carbone. Cette accumulation n'est pas identique pour toutes les espèces de microalgues. Il existe des algues qui accumulent de grandes quantités d'amidon telles que *Chlorella vulgaris* qui peut accumuler de l'amidon à hauteur de 38-48% de sa masse sèche (culture carencée en azote), *Chlamydomonas reinhardtii* qui stocke 35-58% d'amidon (biomasse sèche, culture mixotrophique) et *Tetraselmis subcordiformis* qui accumule jusqu'à 35% d'amidon (biomasse sèche) (Yao *et al.*, 2012).

La structure de l'amidon change avec l'espèce de microalgues. Chez les microalgues de l'espèce *R. violacea* l'amidon floridéen est constitué d'une fraction d'amylose minoritaire (10-30%) et d'une fraction amylopectine majoritaire (70-90%) (Shimonaga *et al.*, 2008 ; Rahaoui, 1999). La composition majoritaire en chaînes d'amylopectine de l'amidon de *Rhodella violacea* permet de définir le polysaccharide comme de type «semi-amylopectine». L'amylopectine produit par les souches de *R. violacea* existe avec des degrés de polymérisation (DP) variables au sein des cellules. En effet, la partie linéaire de la structure de l'amylopectine est constituée de 17% de chaînes courtes qui contiennent un $DP \leq 8$, et 6,2%

Synthèse bibliographique

de chaînes longues avec un $DP \geq 37$. Le DP le plus abondant est 11 (8-10%). Ces proportions restent vérifiées même si l'environnement et les conditions de culture influencent la distribution des longueurs de chaînes (Rahaoui, 1999).

La taille des molécules de réserve diffère d'un microorganisme à l'autre. Les Rhodophytes ont un amidon floridéen de grande taille : 100-200 MDa, alors que les Chlorophyceae (algues vertes) ont un amidon plus petit : 150-750 kDa et les Phaeophyceae (algues brunes) ont un très petit oside de réserve de 2-6 kDa (Kornprobst, 2005).

Les EPS et mucilages de microalgues marines rouges

Les Rhodophyta n'ont pas de paroi cellulosique. Les microalgues rouges produisent un polysaccharide partiellement excrété dans le milieu de culture. En effet, il existe une fraction exopolysaccharidique soluble dans le milieu alors que 50 à 70% du polymère produit par la microalgue reste autour de la cellule pour former un mucilage qui encapsule la microalgue (Evans et Maureen 1974 ; Singh *et al.*, 2000).

Structures

Les porphyridiales produisent des structures complexes d'exopolymères sulfatés. Ce sont des polymères de grande taille avec une masse molaire comprise entre 8.10^5 et 26.10^5 g.mol⁻¹ (Capek *et al.*, 2008 ; Nosálová *et al.*, 2012 ; De Jesus Raposo *et al.*, 2013). Ces EPS sont souvent décrits comme étant des protéoglycanes incluant de 1 à 6% de protéines dans leur structure pour les souches appartenant au genre *Porphyridium* (De Jesus Raposo *et al.*, 2013) et de l'ordre de 13 à 17 % de protéines chez les souches appartenant au genre *Rhodella/Dixoniella* (Geresh *et al.*, 2002 ; Capek *et al.*, 2008 ; Nosálová *et al.*, 2012). Cependant cette qualification de protéoglycane reste encore à confirmer, l'association covalente de protéines avec la structure polysaccharidique n'ayant pas été mise en évidence par les auteurs.

La part osidique de la molécule est comprise entre 60 et 90%, et les 10 à 40% restant sont décrits comme étant des structures peptidiques, des groupements méthoxyle, acétyle et succinyle (Geresh *et al.*, 2002 ; Nosálová *et al.*, 2012). Les monosaccharides identifiés dans ces structures sont le xylose, l'acide glucuronique, le rhamnose, le galactose et le glucose. Le xylose (lié en 1,3 et 1,4) est le monosaccharide majoritaire des EPS de Rhodophytes. Il représente 60% des monosaccharides (Capek *et al.*, 2008 ; Geresh *et al.*, 2009 ; Nosálová *et al.*, 2012). Les EPS contiennent également des substituants sulfates (entre 6 à 10% (m/m)) qui

Synthèse bibliographique

accentue le caractère anionique de ces macromolécules apporté par les acides uroniques (entre 5 et 12% m/m) (Geresh *et al.*, 2002 ; De Jesus Raposo *et al.*, 2013). De façon plus spécifique, l'EPS de *Dixoniella grisea* contient du phosphore, des protéines, des groupements méthyle, acétyle et succinyle (Nosálová *et al.*, 2012). Le groupement méthyle représente 6% de la molécule (Nosálová *et al.*, 2012) et il est majoritairement porté par du xylose (Capek *et al.*, 2008). Chez les souches appartenant au genre *Rhodella*, les substituants sulfates ont été identifiés sur des résidus d'acides uroniques du polymère (Evans et Maureen 1974).

L'exopolymère de *Porphyridium sp.* est composé en partie de l'unité de répétition suivante : [(2 ou 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)]_n- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)-L-Galp(1 \rightarrow qui est rattaché à un squelette principal de structure encore non décrite (Geresh *et al.*, 2009). Après fragmentation du polymère en 2 oligosaccharides, Gloaguen *et al.*, (2004) a également proposé des structures représentatives de l'architecture de l'exopolysaccharide de *Porphyridium sp.* (Figure 23). Geresh *et al.*, (2009) et Gloaguen *et al.*, (2004) ont déterminé des structures qui se ressemblent : le xylose est lié en β et il appartient à la série D. Cependant des différences sont à noter. Par exemple selon Gloaguen *et al.*, (2004) le xylose est lié à un L-galactose en (1,4), le xylose est lié à un autre xylose par une liaison β -(1,4), et il n'y a pas de liaison entre le glucose et le galactose. En revanche, Geresh *et al.*, (2009) ont défini des liaisons entre le xylose et le glucose et entre deux xyloses en β -(1,3).

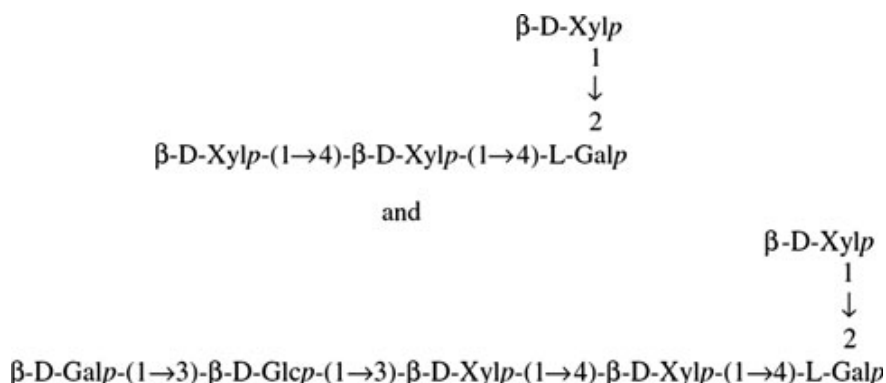


Figure 23 Structure de deux fractions oligosaccharidiques du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium sp.* (Gloagen *et al.*, 2004)

Propriétés rhéologiques

Les polysaccharides extracellulaires de *Porphyridium* et de *Rhodella* donnent des solutions très visqueuses à faible concentration en solution aqueuse. A titre d'exemple, l'exopolysaccharide isolé de la souche de *Porphyridium sp.* donne des solutions aqueuses avec une viscosité (mesurée à l'aide d'un viscosimètre Brookfield DV-2 et d'une géométrie

Synthèse bibliographique

cône/plan) de l'ordre de 23-27 cP à la concentration de 0,25% (m/v) et celui isolé d'une souche de *R. reticulata* donne des solutions avec une viscosité de 29 cP à la même concentration (Geresh *et al.*, 2002). Leur comportement à l'écoulement est non-newtonien et pseudoplastique (De Jesus Raposo *et al.*, 2013). Il peut devenir plastique pour des concentrations de 1% (m/v) (Eteshola *et al.*, 1998). Ce type de comportement est caractérisé par une diminution de la viscosité lorsque la contrainte de cisaillement augmente.

Ce comportement est proche de celui du xanthane en conditions diluées (concentration <1% m/v). Le polymère des microalgues *R. reticulata* est chargé négativement et sa viscosité intrinsèque varie avec la teneur en sel du fait de la diminution des interactions électrostatiques. L'importance de cet effet dépend des espèces d'ions. Ainsi le KCl réduit d'avantage la viscosité intrinsèque par rapport au NaCl, dans le cas de l'étude menée par Eteshola *et al.* (1998).

Activités biologiques

Les exopolysaccharide sulfatés des microalgues ont souvent été décrits comme porteurs d'activités biologiques. Le polysaccharide de *Rhodella grisea* est un agent antitussif spécifique de la toux laryngopharyngée. Il permet de diminuer la fréquence et l'intensité de la toux sans supprimer l'expectoration (Nosálová *et al.*, 2012). Les polysaccharides ainsi que leurs oligomères, obtenus par dégradation microondes, de *P. cruentum* (Sun *et al.*, 2009) et *Porphyridium sp.* (Tannin-Spitz *et al.*, 2005) ont un pouvoir antioxydant. Ils luttent contre les espèces d'oxygène réactives produites sous l'influence de fortes radiations lumineuses.

Les EPS de *P. cruentum* sont également décrits pour leur activité antitumorale et immunomodulatrice (Sun *et al.*, 2012). En effet, ils améliorent la réponse immunitaire en stimulant la prolifération des macrophages et des lymphocytes. Ces activités biologiques sont plus importantes pour des molécules de petites tailles ($M_w = 6,55.10^4 \text{ g.mol}^{-1}$) par comparaison avec les molécules de tailles supérieures ($M_w = 2,56 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) (Sun *et al.*, 2012).

Le polysaccharide de *Porphyridium sp.* a également un effet antiviral contre le virus de l'herpès (HSV-1 et -2) sans présenter d'effet toxique (Huheihel *et al.*, 2002). Cette activité augmente avec la concentration en polymère, et apparaît comme optimale à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Le mode d'action décrit par Huheihel *et al.*, (2002) est une compétition avec les sites d'adhésion du virus sur la cellule hôte.

2. La nosémose des abeilles

2.1. Les microsporidies

Les microsporidies sont des organismes eucaryotes unicellulaires, parasites intracellulaires obligatoires, du règne des champignons. Elles ont été identifiées pour la première fois en 1857 chez le vers à soie (*Nosema bombicis*). Elles parasitent les invertébrés, les vertébrés et les mammifères dont l'Homme. On retrouve le parasite surtout chez les personnes immunodéprimées depuis un peu plus de vingt ans (greffes et SIDA), ce qui fait de la microsporidie un agent opportuniste émergent. La principale famille de microsporidies rencontrée chez l'Homme est celle des *Encephalitozoonidae* (Deverriere, 2003). Elles ont longtemps été considérées comme des protistes, à la base de l'arbre phylogénétique des eucaryotes, du fait de l'absence de mitochondrie. Ce sont des analyses de séquences d'ADN (il existe plusieurs marqueurs) qui ont mis en évidence leur affiliation au règne des champignons (Keeling et Fast, 2002). Elles sont également dépourvues de peroxyosomes et leurs ribosomes sont semblables à ceux des procaryotes. Ce sont des spores infectieuses, résistantes, ovoïdes et de petite taille : 2-7 μm sur 1,5-5 μm (Bigliardi et Sacchi, 2001) (Figure 24).

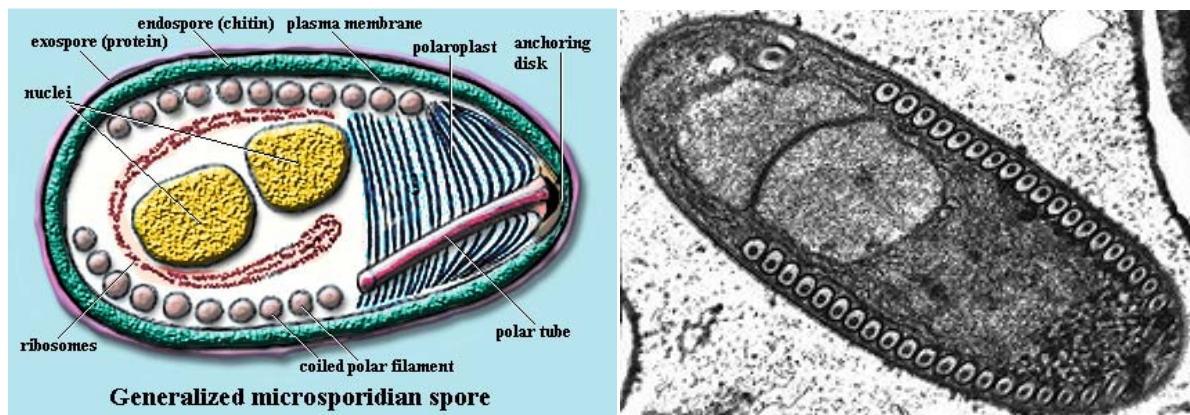


Figure 24 Schéma et image en microscopie électronique à transmission d'une spore. A gauche image de palaeos.com/Eukarya. A droite *Fibrillanosema crangonycis* [5].

Les spores sont constituées d'une paroi, d'un sporoplasme, d'une vacuole antérieure et postérieure et d'un tube polaire (ou filament polaire). Le sporoplasme contient soit un seul nuclei (*Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*) soit deux (*Nosema*) (Bigliardi et Sacchi, 2001). Le filament polaire est fixé sur la paroi au niveau de la face interne du pôle apical de la spore. Il est enroulé dans le cytoplasme et occupe la quasi totalité de la spore.

2.2. Les abeilles

Les abeilles sont des insectes hyménoptères et butineurs qui jouent le rôle de pollinisateurs. Il existe quatre grandes catégories d'abeilles. Les abeilles sociales, vivant en colonies mais ne produisant pas ou peu de miel ; les abeilles à miel (ou « domestiques » en langage commun) ; les abeilles solitaires qui ne forment pas de colonie et les abeilles parasites qui parasitent les couvains d'autres espèces.

Les abeilles à miel sont des insectes sociaux élevés par l'homme pour la production de miel. Il en existe deux espèces : l'abeille européenne (*Apis mellifera*) et l'abeille asiatique (*Apis ceranae*). Au sein d'une colonie on distingue 3 catégories d'abeilles: les ouvrières, les faux-bourdon et la reine (Figure 25).

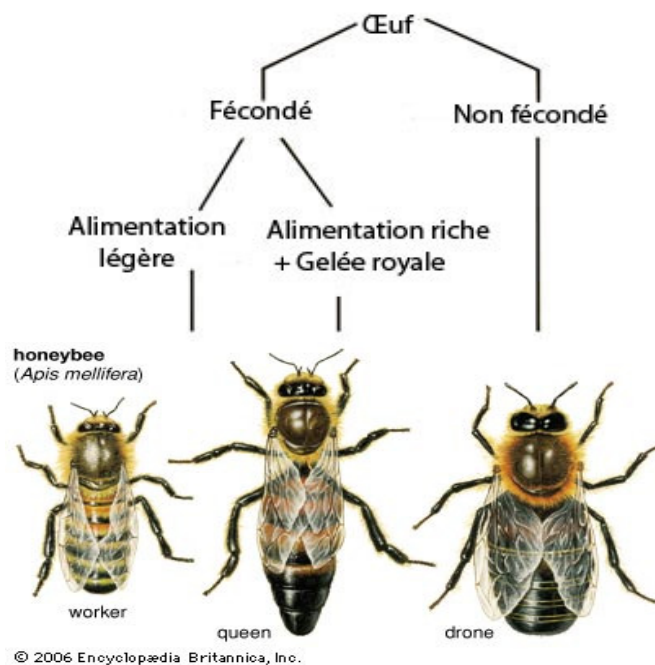


Figure 25 Les différentes classes d'abeilles et leur morphologie [6].

-Les ouvrières sont les abeilles travailleuses de la ruche. Elles permettent le bon fonctionnement de l'essaim et sa survie. Elles vivent de quelques semaines à quelques mois en fonction de la saison. Elles sont réparties selon 6 tâches :

- Les butineuses qui récoltent les nectars et les pollens,
- Les magasinieres qui fabriquent le miel,
- Les ventileuses qui s'occupent de l'aération de la ruche,
- Les gardiennes qui assurent la sécurité de l'essaim,

Synthèse bibliographique

Les nourrices qui alimentent les larves et les jeunes abeilles,

Les nettoyeuses qui assurent la propreté de la ruche et des rayons.

-Les faux-bourçons sont les mâles reproducteurs de la ruche qui meurent après l'accouplement.

-Les reines fournissent les œufs et elles sont les plus grosses abeilles de la ruche avec une longévité de 3 à 4 ans. On trouve une reine par ruche. La reine pond au printemps et en été. Les futures reines sont élevées à part des autres larves. A la ponte, l'œuf de reine est identique à celui des ouvrières. C'est l'alimentation des larves qui va induire la croissance des abeilles pour donner des reines. En effet, les larves de reines sont nourries exclusivement avec de la gelée royale pendant tout leur développement. Les autres larves sont nourries avec trois fois moins de gelée royale (Figure 26).



Figure 26 Larve de reine d'abeille dans sa gelée royale [6].

Les abeilles peuvent être atteintes de maladie telle que la nosémose. La nosémose est la conséquence d'une infection des abeilles par un parasite les microsporidies du genre *Nosema*.

2.3. Impact de la nosémose sur l'apiculture

Les abeilles productrices de miel voient à l'heure actuelle leur population décroître de façon importante. La diminution des abeilles est la conséquence de multiples stress environnementaux et d'infections virale ou parasitaire. Parmi ces infections, la nosémose a un impact non négligeable sur la longévité des abeilles et de leur ruche.

La nosémose touche l'abeille à tout âge et la quantité de spores ainsi que le nombre d'abeilles infectées augmentent avec l'âge de celles-ci. La mortalité des abeilles est accrue au fur et à mesure de leur vieillissement. Cependant, il existe plusieurs facteurs de mortalité tels que des effets de synergie entre les différents pathogènes de l'abeille et des facteurs

Synthèse bibliographique

environnementaux. La contamination des abeilles est aléatoire. En effet, certaines abeilles ne seront jamais atteintes quel que soit leur rôle au sein de la ruche, à l'intérieur ou à l'extérieur. A ce jour, il n'existe pas d'explication à ce phénomène (Smart et Sheppard, 2012). La diminution de la longévité des abeilles et de la production de miel est la conséquence de l'augmentation de la prévalence de la maladie qui augmente avec l'âge.

Dès le premier jour d'infection des abeilles ouvrières (*Apis mellifera*) par *N. ceranae*, il y a diminution de l'expression des gènes de peptides antimicrobiens responsables de l'immunité à médiation humorale (Chaimanee *et al.*, 2012) par un phénomène d'immunosuppression induit par le parasite. Cependant l'expression de ces gènes redevient normale après 12 jours d'infection. La spore ayant un cycle de développement de 6 jours, elle a pu au cours de cette période réaliser deux cycles d'infection. L'infection entraîne un stress énergétique chez l'abeille. Ce stress provoque une augmentation de l'appétit caractérisée par une augmentation de la consommation de saccharose (Mayack et Naug, 2009). La microsporidie n'a pas de catabolisme énergétique (absence de mitochondrie) et détourne le métabolisme énergétique de la cellule hôte pour son développement. Pour compenser cette perte d'énergie, l'abeille augmente sa consommation d'aliments. Si les ressources alimentaires ne sont pas suffisantes la mortalité des abeilles est accrue. Pour répondre aux besoins supplémentaires en aliments les butineuses travaillent d'avantage et sortent donc plus de la colonie ce qui a deux conséquences majeures. La première est l'augmentation de la dissémination des parasites dans l'environnement. La seconde est un phénomène de désertification de la colonie (Mayack et Naug, 2009).

Le parasite atteint sa charge infectieuse maximale à 14 jours post-infection et entraîne la mort des abeilles à partir de 15 jours après l'infection. La mort de façon précoce des abeilles butineuses les plus âgées entraîne un déséquilibre au sein de la ruche qui produit un stress supplémentaire (Dussaubat *et al.*, 2013). En effet, les abeilles mortes ne sont pas remplacées immédiatement. La survie de la ruche dépend donc principalement de la capacité de la reine à les remplacer rapidement. Cependant, en période hivernale la ruche entre en stase et les abeilles ne peuvent plus être remplacées à la même fréquence. De plus, il existe un phénomène de transmission horizontale au sein de la ruche qui peut induire la contamination de la reine. Dès que la reine est contaminée, il existe un risque accru de mortalité de la ruche et de contamination des abeilles et des futures reines. Lorsque la reine est parasitée par *Nosema ceranae* tous ses tissus contiennent des spores. Il y a donc infection des ovaires et de la spermathèque. Par conséquent, il existe un risque de contamination verticale. Selon Traver

Synthèse bibliographique

et Fell (2012) ce risque est plus important pour les larves de reines et les jeunes reines puisque des microsporidies peuvent également être présentes dans la gelée royale. Les ouvrières nourricières peuvent également contaminer les larves ouvrières mais le risque est plus faible car les larves ouvrières sont peu nourries avec de la gelée royale. Lorsque la gelée royale nourricière est contaminée, il a été observé une augmentation de la mortalité des larves de futurs reines et un faible taux d'infection des survivantes.

Par conséquent, il peut s'avérer nécessaire de changer de reine tous les ans pour éviter ce phénomène ce qui représente un surcoût non négligeable pour l'apiculture. La nosérose infeste rapidement une ruche et la dissémination est rapide et invisible. Lorsque le diagnostic de contamination est posé il est difficile d'enrayer la maladie. Par conséquent, les traitements préventifs constituent la meilleure stratégie de lutte contre cette pathologie.

2.4. Microsporidies et abeilles – Le mécanisme de l'infection

2.4.1. La nosérose chez les abeilles

Les microsporidies envahissent principalement les cellules épithéliales de l'intestin des abeilles ce qui déclenche la nosérose qui se traduit par une diarrhée et une augmentation de l'appétit, associées à une diminution de l'espérance de vie des abeilles. A long terme, la nosérose peut conduire à la disparition de la ruche.

Il existe plus de 150 espèces de *Nosema* qui infectent 12 ordres d'insectes (Higes *et al.*, 2007) dont les abeilles. Les abeilles européennes de l'espèce *Apis mellifera* sont importantes économiquement car outre la production de miel, elles participent activement à la pollinisation des plantes dont le coût annuel est évalué à 153 billions d'euros à l'échelle mondiale, avec 14,2 billions d'euros pour l'Europe et 14,4 billions d'euros aux Etats-Unis. Les abeilles sont indispensables pour la production agricole, elles représentent 9,5% de la valeur totale de la production (Van Engelsdorp et Meixner, 2010).

La nosérose chez les abeilles est provoquée par les microsporidies de l'espèce *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. L'infection par *Nosema apis* a été décrite il y a plus de 100 ans chez *Apis mellifera*. Elle entraîne une faible mortalité des abeilles.

Depuis une vingtaine d'années *Nosema ceranae* qui est le parasite de l'abeille asiatique *Apis ceranae* a été identifié chez *Apis mellifera*. De même *Apis ceranae* est infectée par *Nosema apis* (Chen *et al.*, 2009 ; Traver et Fell, 2011). Aujourd'hui les deux espèces d'abeilles sont infectées par les deux espèces de *Nosema* de façon simultanée ou individuelle. Ce phénomène

Synthèse bibliographique

est apparu avec les échanges d'abeilles entre l'Europe et l'Asie. En Europe, le parasite *N. ceranae* se développe rapidement et la prévalence de la microsporidie est devenue nettement supérieure à celle de *N. apis*. *N. ceranae* possède probablement un meilleur mécanisme de défense contre le système immunitaire de son nouvel hôte (Chen *et al.*, 2009). *Nosema ceranae* est une espèce très répandue et plus virulente que *Nosema apis*. Elle est responsable de l'augmentation de la mortalité des abeilles dans le monde. On la retrouve dans 66% des colonies en France et 50% aux Etats- Unis (70% dans l'état de Virginie). Même si *N. ceranae* semble avoir remplacé *N. apis*, les observations sont néanmoins hétérogènes selon la localisation géographique des abeilles (Traver et Fell, 2011). Le climat ainsi que de multiples autres facteurs modulent la résistance des abeilles et la virulence des parasites (Lambert *et al.*, 2012). Pour le moment, les mécanismes responsables de ce phénomène sont encore mal connus.

2.4.2. Cycle des microsporidies

Le cycle des spores est rapide et dure de 24 à 72h (Deverriere, 2003 ; Higes *et al.*, 2007). Ce cycle est constitué de trois phases : la phase infectieuse (germination), la phase de prolifération (multiplication cellulaire dans les cellules hôtes) et la phase sporogonique (maturation).

2.4.2.1. La phase infectieuse

Les spores infectieuses reçoivent un signal issu de leur environnement qui va déclencher la germination. Selon Hayman *et al.*, (2005), la microsporidie *Encephalitozoon intestinalis* utilise la communication cellulaire, via les glycosaminoglycanes présents sur la surface de la cellule hôte, pour identifier puis s'attacher à cette cellule l'hôte.

Une fois que la microsporidie est attachée, elle dévagine son tube polaire en perçant sa paroi (Figure 27, étape B) puis la membrane de la cellule hôte (Figure 27, étape C). Ensuite il y a une augmentation de la pression intrasporale (Figure 27, étapes C à E) et le contenu de la spore est éjecté dans la cellule hôte (Figure 27, étapes E-F). Ce phénomène est très rapide (2 secondes).

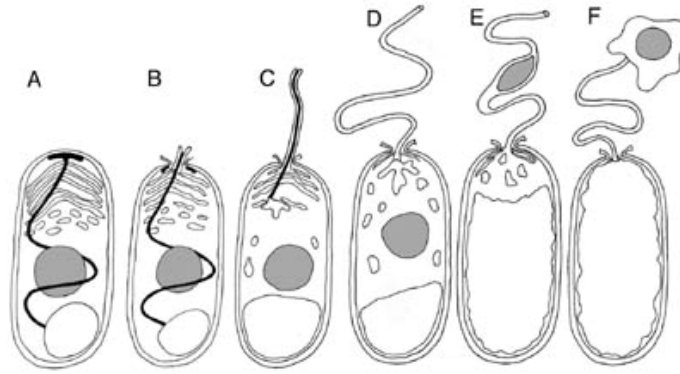


Figure 27 Processus de germination des microsporidies : mécanisme d'extrusion du tube polaire (Keeling et Fast, 2002)

2.4.2.2. La phase de prolifération

La phase de prolifération est aussi appelée mérogonie ou schizogonie et se déroule dans la cellule hôte. Lors de cette phase, les spores immatures (les mérontes) se retrouvent soit directement dans le cytoplasme (*Enterocytozoon*), soit dans une vacuole parasitophore (*Encephalitozoon*) (Deverriere, 2003). Les sporoplasmes entrent dans les cellules et les mérontes se multiplient par division binaire et mûrissent dans les cellules hôtes jusqu'au stade de sporontes. Les mérontes sont arrondies et possèdent une membrane unique et un gros noyau.

2.4.2.3. La sporogonie

Cette phase permet l'obtention de spores à partir de la maturation des sporontes. Ce stade débute par la formation d'une paroi autour des mérontes (Bigliardi et Sacchi, 2001). Le cytoplasme des sporontes se densifie avec la formation des organites : production de ribosomes, formations du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et du filament polaire. Les sporontes se divisent et à chaque division les cellules se densifient. La scission binaire finale donne deux sporoblastes. Les sporoblastes ne se divisent pas et donneront les spores. L'augmentation du nombre et du volume des spores va provoquer la rupture de la membrane de la cellule hôte, entraînant la libération des spores.

2.4.3. Le mécanisme de l'infection

La spore infecte la cellule hôte par un seul mécanisme. Les microsporidies amorceraient la phase d'infection en adhérant aux glycosaminoglycanes (GAGs) présents sur la face extracellulaire des membranes des cellules hôtes (Hayman *et al.*, 2005). Les GAGs sont une famille d'hétéropolysaccharides de structures complexes incluant l'héparine, les héparines

Synthèse bibliographique

sulfates, les acides chondroïtique et hyaluronique. Ils sont présents dans les tissus animaux sous la forme GAGs mais également sous la forme de protéoglycosaminoglycanes lorsqu'ils sont associés à une protéine (Figure 28).

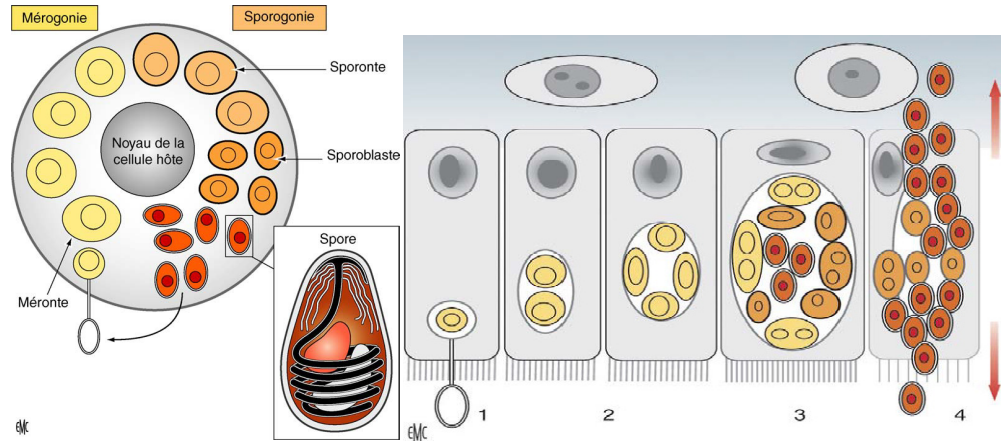


Figure 28 Schéma bilan du cycle des microsporidies (Desportes-Livage et Datry, 2005). Développement d'*Encephalitozoon intestinalis* dans les cellules intestinales.

La partie osidique est une répétition d'une unité disaccharidique, composée d'un ose aminé, N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine et d'un acide uronique (acide glucuronique ou iduronique) (Raveendran *et al.*, 2013). Excepté l'acide hyaluronique, tous les GAGs sont sulfatés. Pour pouvoir infecter les cellules, les spores doivent obligatoirement pénétrer la cellule par leur filament polaire. En effet, selon Hayman *et al.*, (2005) lorsque les cellules immunitaires phagocytent les spores, celles-ci n'infectent pas la cellule. La spore doit donc être en contact direct avec la membrane plasmique de la cellule hôte (Figure 29 A) avant de déplier son tube polaire pour transférer son contenu dans la cellule (Figure 29 B).

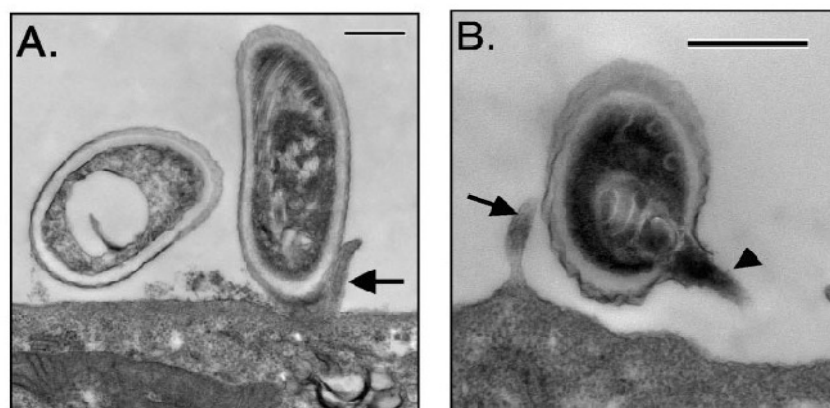


Figure 29 Adhésion de la spore *Encephalitozoon intestinalis* à une cellule de l'épithélium colorectal humain. Image d'*Encephalitozoon intestinalis*, obtenue au microscope à transmission électronique (Hayman *et al.*, 2005).

Synthèse bibliographique

A trois jours de développement les parasites sont encore dans les cellules hôtes, les parasites en phase de multiplication (IPS) sont visibles au microscope (Figure 30).

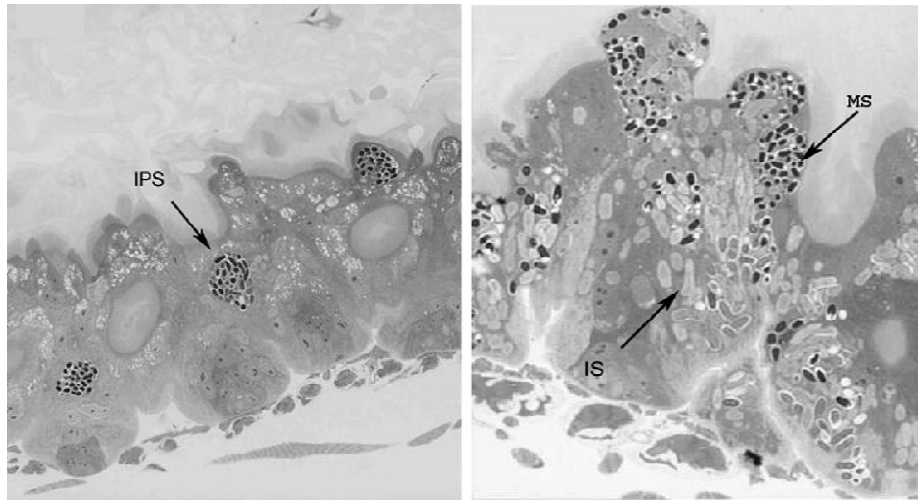


Figure 30 Infection des cellules de l'intestin d'abeilles *Apis mellifera* par *Nosema ceranae*. Infestation à 3 et 6 jours. Coloration au bleu de Méthylène (Higes *et al.*, 2007).

A six jours d'infection, les cellules sont envahies par des spores matures et des spores en cours de maturation. On observe des spores avec des formes et des tailles différentes en fonction de leur stade de développement. Les spores matures (MS) sont dans la région apicale des cellules épithéliales. Il existe également des microsporidies en cours de maturation (IS) (Higes *et al.*, 2007). Les microsporidies terminent leur développement au bout de 6 jours.

2.5. Traitements de la nosémose

La nosémose est la maladie la plus létale pour les abeilles adultes (Reybroeck *et al.*, 2012).

L'étude génétique est à l'heure actuelle le seul moyen efficace de diagnostic d'une nosémose. Ainsi, la PCR en temps réel permet de quantifier et d'identifier les microsporidies *N. ceranae* et *N. apis* (Bourgeois *et al.*, 2010). De nos jours, il existe un seul traitement reconnu efficace contre le développement des parasites. Il s'agit de la fumagilline (Fumidil B) (Figure 31).

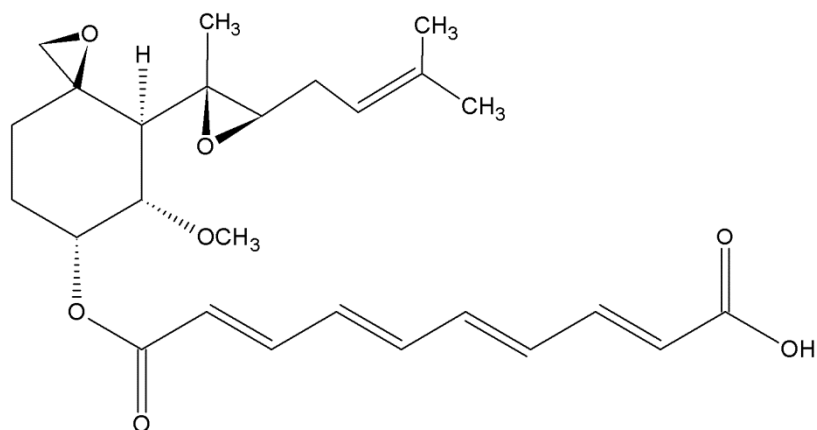


Figure 31 Fumagilline.

La fumagilline est un antibiotique produit par *Aspergillus flavus* qui est interdit en Europe pour les ruches à production de miel. Le produit a en effet tendance à s'accumuler dans le miel et y reste fixé. Cette molécule est encore utilisée aux Etats-Unis (uniquement dans les périodes de non production de miel (automne et hiver)) en prévention et comme traitement curatif au Canada et en Inde.

La fumagilline introduite dans le sirop de nourrissage des abeilles perturbe la réplication de l'ADN du parasite. Ce traitement perd de son efficacité au bout d'un an. Il permet une diminution temporaire de la mortalité des abeilles. Selon Williams *et al.*, (2008) la mortalité des abeilles peut être diminuée en mettant les ruches à l'abri en hiver ce qui permet d'augmenter le nombre d'abeilles au printemps et la probabilité de survie de la ruche. Cependant comme l'incidence de la maladie augmente en période de confinement des abeilles et de stress (Reybroeck *et al.*, 2012), il est possible que cela ait un effet aggravant sur la prolifération de la nosémoze.

D'autres molécules ont également un effet sur la spore de *Nosema*. Ainsi, la sulfonamide (Figure 32) peut être additionnée au sirop de nourrissage hivernal. Certains éleveurs l'utilisent encore, bien qu'elle soit interdite depuis les années 70.

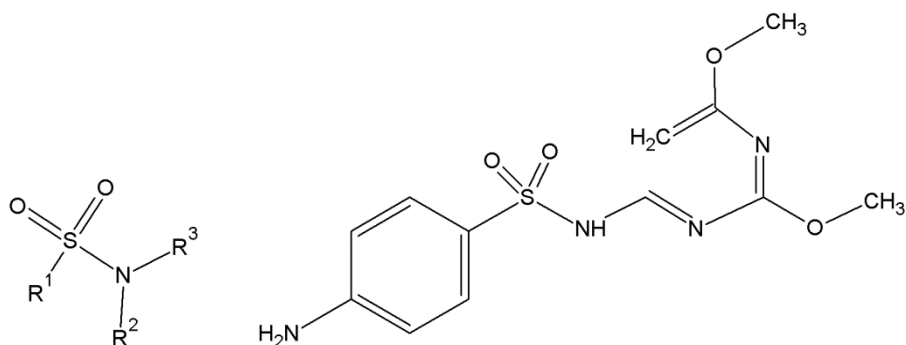


Figure 32 Sulfonamides et Sulfadiméthoxine.

En Argentine, les fluoroquinolones contenant de la sulfadiméthoxine, du triméthoprim et de l'oxytétracycline (Figure 33) sont encore utilisées.

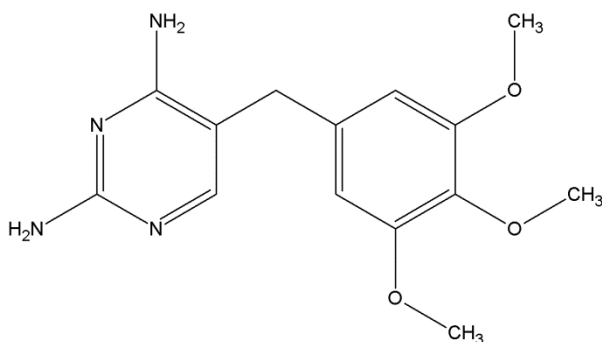


Figure 33 Triméthoprim.

Les nitroimidazoles sont interdits en Europe, pour traiter toutes les espèces productrices de composés entrant dans l'alimentation. La forme 5-nitroimidazole (Figure 35) fut utilisée en Chine pour prévenir et contrôler la nosémose au sein d'une ruche (Reybroeck *et al.*, 2012). Les apiculteurs Chinois préféraient utiliser les nitroimidazoles du fait de leur prix plus faible que la fumagilline mais ces derniers sont aujourd'hui interdits en alimentation animale dans ce pays.

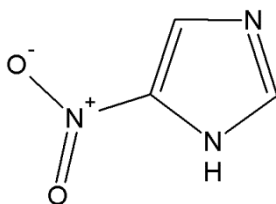


Figure 34 5-nitroimidazole.

Synthèse bibliographique

Le traitement le plus efficace en prévention reste donc la fumagilline. Depuis son interdiction en Europe la prévalence de la nosérose a augmenté, et il est donc d'un grand intérêt de trouver un traitement efficace pour le remplacer.

Les glycosaminoglycanes sont des hétéropolysaccharides complexes et sulfatés, chargés négativement, et présentant de multiples fonctions biologiques (Stick et Williams, 2010 ; Taylor *et al.*, 2009). Ils sont en particulier impliqués dans les phénomènes de communication cellulaire. La plupart de ces fonctions leur sont conférés par leur structure particulière, consistant dans la répétition d'une unité disaccharidique spécifique à chaque GAG, la présence d'acides uroniques, et de groupements sulfate (excepté dans le cas de l'acide hyaluronique). La structure de 5 glycoaminoglycanes est présentée sur la Figure 35.

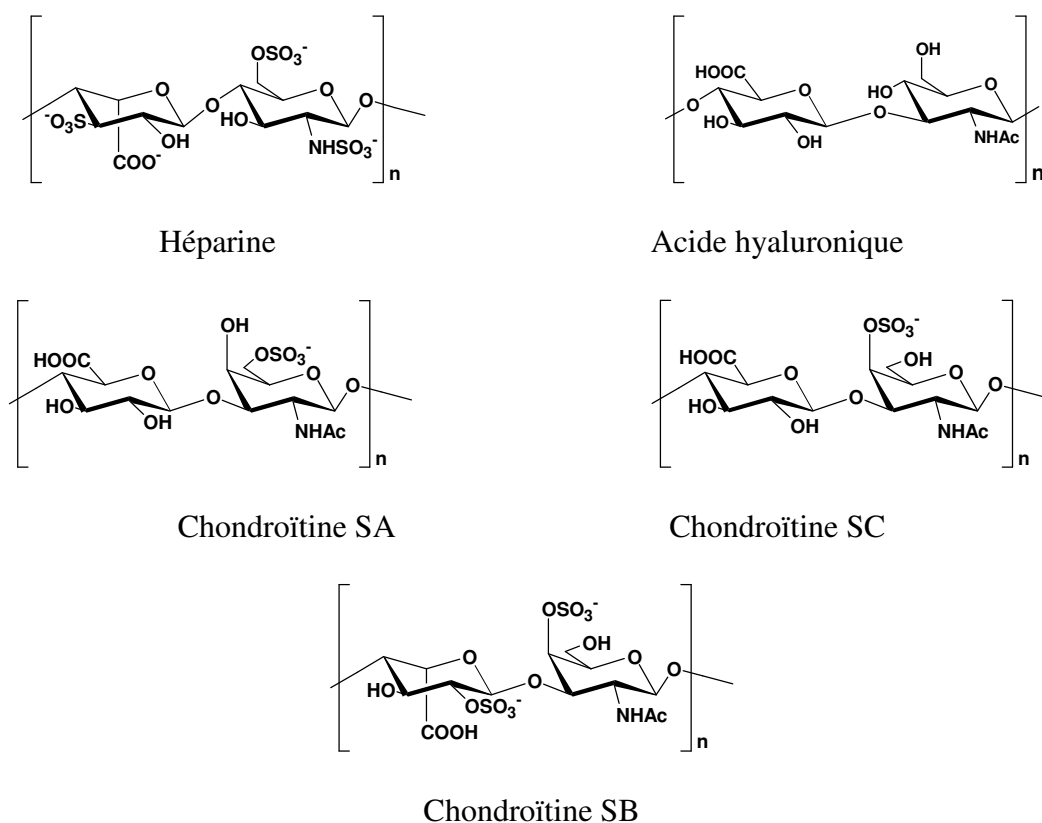


Figure 35 Structure des Glycosaminoglycanes, exemple de cinq molécules.

Des polysaccharides sulfatés tels que des carraghénanes ou des polymères mimétiques de GAG ont été clairement identifiés comme impliqués dans l'adhésion et le mécanisme

Synthèse bibliographique

d'invasion du parasite de la malaria, *Plasmodium falciparum* chez l'homme (Adams *et al.*, 2005; Mathias *et al.*, 2013). De plus, une étude menée par Hayman *et al.*, (2005) sur la microsporidie *Encephalitozoon intestinalis*, suggère que l'infection des cellules hôte pourrait se faire via le système de communication cellulaire en se fixant sur les glycosaminoglycanes (GAG) de surface.

L'une des stratégies consisterait donc à contrôler l'invasion des microsporidies en inhibant le mécanisme d'adhérence de la spore à sa cellule hôte. Dans ce contexte, les polysaccharides sulfatés, abondamment présents chez les macroalgues, microalgues et cyanobactéries, et présentant une structure mimétique de glycoaminoglycanes, pourraient être de bons candidats pour prévenir l'invasion des cellules hôte par les microsporidies.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1. Microalgues

1.1. Souches

Les microalgues utilisées dans ce travail de thèse sont :

-*Rhodella violacea* LMGEIP 001. La microalgue provient du Muséum d'Histoire Naturelle (Paris) et est conservée dans la collection de microalgues du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement de l'Université Blaise Pascal.

-*Rhodella violacea* (Kornmann), Wehrmeyer de la banque de microalgues Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) CCAP 1388/5.

-*Rhodella maculata*, Evans (1970) CCAP 1388/2.

-*Porphyridium purpureum* (Bory), Drew et Ross (1965) CCAP 1380/1A.

-*Porphyridium marinum*, Kylin (1937) CCAP 1380/10.

-*Arthrospira platensis* PCC 8005 (cyanobactérie).

1.2. Milieux et conditions de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour la culture des microalgues.

Le milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962) est le milieu de culture standard des souches du genre *Rhodella*. Il peut également être utilisé pour la culture des souches du genre *Porphyridium*. Ce milieu est composé pour 1 L d'eau de mer artificielle de :

- 1 mL d'une solution de microéléments
- 1 mL d'une solution de vitamines
- NaNO₃ 0,075 g
- NaH₂PO₄·2H₂O 0,00565 g

Matériels et Méthodes

La composition de l'eau de mer artificielle utilisée est:

- NaCl 28,13 g
- KCl 0,77 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,60 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4,80 g
- NaHCO_3 0,11 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,50 g
- Eau distillée qsp 1 000 mL

La solution de microéléments est constituée de :

- Na_2EDTA 4,16 g
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3,15 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,022 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,18 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,006 g
- Eau distillée qsp 1 000 mL

La solution mère de vitamines est constituée de :

- Cyanocobalamine (Vitamine B_{12}) 0,0005 g
- Thiamine HCl (Vitamine B_1) 0,1 g
- Biotine 0,0005 g
- Eau distillée qsp 1 000 mL

La procédure pour préparer le milieu f/2 consiste à ajuster le pH de l'eau de mer artificielle à 8 puis à la stériliser à 120°C pendant 20 min. Les solutions mères de microéléments et de vitamines, stockées à 4°C, sont ajoutées extemporanément par filtration stérilisante à 0,22 μm .

Le milieu Provasoli modifié (West et McBride, 1999) est le milieu standard de culture des souches de *Porphyridium*. Il peut également être utilisé pour la culture des souches de *Rhodella*.

Matériels et Méthodes

Le milieu se prépare avec une base de solutions concentrées (solutions stock) :

- 100 mL d'une solution stock de fer-EDTA
- 200 mL d'une solution stock d'ions métalliques
- 110 mL d'une solution stock de NaNO_3 à 35 g.L^{-1}
- 8 mL d'une solution stock de $\text{Na}_2\text{DL-}\beta\text{-glycérophosphate,5H}_2\text{O}$ à 50 g.L^{-1}
- 8,75 mL d'une solution de vitamine B_{12} à $0,01 \text{ g.L}^{-1}$
- 8 mL d'une solution de thiamine à $0,05 \text{ g.L}^{-1}$
- 8 mL d'une solution de biotine à $0,005 \text{ g.L}^{-1}$

La solution stock d'ions métalliques est constituée de :

- Na_2EDTA 1 g
- H_3BO_3 1,12 g
- $\text{CoSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g
- $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 0,022 g
- $\text{MnSO}_4,\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g
- Eau distillée qsp 1 000 mL

La solution stock de fer-EDTA est constituée de :

- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2,6\text{H}_2\text{O}$ 0,7 g
- Na_2EDTA 0,6 g
- Eau distillée qsp 1 000 mL

Les solutions de vitamines sont stérilisées par filtration ($0,22 \mu\text{m}$) alors que les autres solutions salines et l'eau de mer artificielle sont stérilisées à 120°C pendant 20 min. Le milieu de culture est finalement obtenu en mélangeant les solutions stock avec de l'eau de mer artificielle.

Le milieu BG 11 (Allen et Stanier, 1968) est le milieu standard de culture des cyanobactéries, parfois utilisé pour d'autres microalgues. Ce milieu a été utilisé pour le nettoyage des cellules de *Rhodella violacea* lors de l'extraction de leur ADN.

Le milieu contient :

- NaNO_3 1,5 g
- K_2HPO_4 31 mg
- $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 75 mg
- $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$ 36 mg

Matériels et Méthodes

- Acide citrique 7 mg
- Na₂EDTA 1 mg
- Na₂CO₃ 20 mg
- Citrate de fer ammoniacal 6 mg
- Solution de sels métalliques 1 mL
- Eau distillée qsp 1 000 mL

La solution de sels métalliques est composée de :

- H₃BO₄ 715 mg
- MnCl₂.4H₂O 452 mg
- ZnSO₄.7H₂O 56 mg
- Na₂MoO₄.2H₂O 97 mg
- CuSO₄.5H₂O 20 mg
- Cu(NO₃)₂.6H₂O 12,5 mg
- Eau distillée qsp 250 mL

Le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

Le milieu Eau de Mer Artificielle (EMA) (Jones *et al.*, 1963) est utilisé pour les cultures de *Porphyridium cruentum*. Il peut être utilisé pour la culture des microalgues du genre *Rhodella*.

Le milieu est constitué de :

- NaCl 27 g
- MgSO₄.7H₂O 6,6 g
- MgCl₂.6H₂O 5,6 g
- CaCl₂.2H₂O 1,5 g
- KNO₃ 1 g
- KH₂PO₄ 0,07g
- NaHCO₃ 0,04 g
- FeCl₃. 6H₂O 1 mL d'une solution à 2,82 mg.mL⁻¹ dans du Na₂EDTA 0,05 M
- Solution de microéléments 1 mL
- Vitamine B₁₂ 2,5 mL d'une solution à 1 mg.100mL⁻¹
- Eau distillée qsp 1 000 mL

Matériels et Méthodes

La solution mère de microéléments contient :

- ZnCl_2	4 mg
- H_3BO_3	60 mg
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4 mg
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40 mg
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	37 mg
- Eau distillée	qsp 100 mL

Le pH est ajusté à 7,6 puis le milieu est stérilisé par filtration à 0,2 μm .

Le milieu Hemerick (1973) est un milieu utilisé pour la culture des microalgues rouges. Il est issu du mélange de trois solutions préparées séparément.

La solution d'eau de mer artificielle contient :

- NaCl	29 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12,3 g
- NaNO_3	175mg
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,75 g
- KCl	1,47 g
- Solution de microéléments	1 ml
- Eau distillée	qsp 900 mL

La solution de microéléments est constituée de :

- H_3BO_3	2 mg
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8 mg
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	213mg
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 mg
- $\text{O}_5\text{SV} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	43mg
- CoSO_4	91mg
- Eau distillée	qsp 1 000 mL

Matériels et Méthodes

La solution de phosphate contient :

- | | |
|-----------------|------------|
| - K_2HPO_4 | 1,7 g |
| - Fe-EDTA | 50 mg |
| - Eau distillée | qsp 100 mL |

Le pH de la solution d'eau de mer est ajusté à pH 7,5. Les solutions d'eau de mer et de phosphate sont stérilisées à 120°C pendant 20 min, avant d'être mélangées. La solution de microéléments est stérilisée par filtration à 0,22 μm .

Après comparaison avec le milieu EMA, les concentrations de 2 composés ont été modifiées (KCl 0 g et $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 6,15 $g \cdot L^{-1}$). Le milieu est appelé milieu Hemerick modifié.

Le milieu Zarrouk modifié (Cogne *et al.*, 2003) est utilisé pour la culture de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* PCC 8005 (spiruline).

Il contient (pour 1L d'eau milliQ) :

- | | |
|-----------------------------|-------------|
| - NaCl | 1,0 g |
| - $CaCl_2$ | 0,03 g |
| - K_2SO_4 | 1,0 g |
| - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,2 g |
| - K_2HPO_4 | 0,5 g |
| - $NaNO_3$ | 2,5 g |
| - $NaHCO_3$ | 10,5g |
| - Na_2CO_3 | 7,6 g |
| - EDTA | 0,08 g |
| - $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,01g |
| - Solution d'éléments trace | 1mL |
| - Eau distillée | qsp 1000 mL |

La solution d'éléments trace contient :

- | | |
|------------------------|------------|
| - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0,23g |
| - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,11 g |
| - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,03 g |
| - Eau distillée | qsp 1000mL |

Le pH final du milieu est ajusté à 9,5.

Matériels et Méthodes

Les différentes espèces de microalgues ne se conservent pas par congélation à -20 ou -80°C. Elles sont maintenues en culture et repiquées tous les deux mois dans des Erlenmeyers (Erlens) de 250 ou 500 mL contenant respectivement 110 ou 330 mL du milieu correspondant. L'inoculation est réalisée à raison de 10% du volume final par une culture en phase exponentielle de croissance. Toutes ces cultures « souchier » sont incubées à 24 °C sous une irradiance de 100 $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, avec un cycle jour/nuit 16/8h.

1.3. Conditions de culture testées pour les souches de l'espèce *R. violacea* LMGEIP 001

Deux conditions de culture en mixotrophie (photosynthèse et respiration) et deux conditions en hétérotrophie (respiration seule) ont été testées avec les milieux de culture f/2, Hemerick et EMA :

- Glucose (20 g.L⁻¹) en cycle jour/nuit 16/8h
- Glucose (20 g.L⁻¹) à l'obscurité
- Glucose (20 g.L⁻¹) + bicarbonate 20 mM en cycle jour/nuit 16/8h
- Glucose (20 g.L⁻¹) + bicarbonate 20 mM à l'obscurité

L'apport en glucose est réalisé à partir d'une solution stérile de glucose à 50% (m/v).

Les milieux de culture f/2, Hemerick, Hemerick modifié et EMA ont été testés en autotrophie :

- Autotrophie cycle jour/nuit 16/8h
- Autotrophie cycle jour/nuit 16/8h + bicarbonate 20mM

1.4. Mesure de l'activité photosynthétique

La photosynthèse entraîne la formation d'hydrates de carbone associés à un dégagement de dioxygène. Pour suivre l'activité photosynthétique des microorganismes, la production de dioxygène par les microalgues est mesurée en utilisant une électrode de Clark (Figure 36).

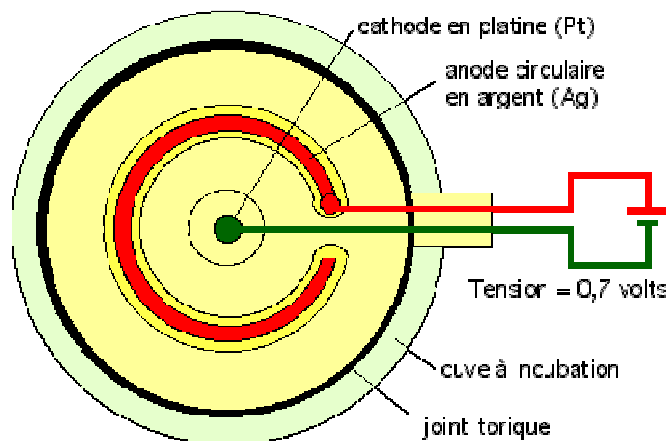
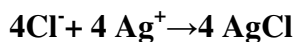


Figure 36 Electrode de Clark

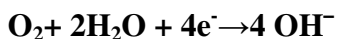
L'électrode de Clark est un oxymètre à sonde polarographique. La sonde est constituée d'une cathode de platine et d'une anode d'argent entre lesquelles est maintenue une différence de potentiel de 0,7 V. L'électrode contient une solution de KCl à 50%. Au niveau de l'anode en argent, la différence de potentiel induit l'oxydation de l'argent.



Les ions Ag^+ formés se complexent alors avec les ions chlorure selon la réaction suivante :



Le dioxygène issu de la cellule de mesure va être réduit par les électrons issus de l'anode selon la réaction suivante qui a lieu au niveau de la cathode de platine



Ces réactions permettent la formation d'un courant électrique qui sera proportionnel à la concentration en dioxygène dissous.

L'électrode est disposée dans une chambre thermostatée de 2 mL avec un système d'agitation utilisant un barreau aimanté (DW2/2 de Hansatech Instruments) (Figure 37).



Figure 37 Chambre DW2/2 et unité de contrôle

Matériels et Méthodes

Le traitement des données est réalisé avec le logiciel Oxygraph Plus Software qui permet de tracer des courbes de production de dioxygène en fonction du temps.

La lumière est apportée par une lampe de lumière blanche de haute intensité LS2 (Hansatech). La lampe est connectée à la chambre par une fibre optique A8 LS2/FO. L'intensité lumineuse peut être diminuée en utilisant des filtres neutres A5 (transmission : 80%, 50%, 25%, 10%, 1,7%). La lampe possède deux emplacements à filtre ce qui permet de moduler l'intensité lumineuse dans une gamme d'irradiance comprises entre 0 et 8 384 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. L'irradiance à l'intérieur de la chambre est contrôlée pour toutes les combinaisons possibles de filtres avec un photomètre (LI-189 Quantum/Radiomètre/Photomètre). Pour la mise en œuvre de la mesure, 2mL de cultures contenant $3,1.10^5$ cellules.mL⁻¹ sont déposés dans la chambre. Les microalgues sont dans le milieu f/2 auquel 20 mM de NaHCO₃ ont été ajoutés afin que les microorganismes ne soient pas limités en source de carbone lors de la mesure de l'activité photosynthétique. L'activité des algues est mesurée pendant 15 min.

Pour déterminer les valeurs optimales d'irradiance et de température, des modèles mathématiques sont utilisés.

La courbe d'irradiance est obtenue en utilisant le modèle d'Eilers et Peeters (1988) (Equation 3).

$$rO_2 = rO_{2max} \frac{G}{K_1 + G + (G^2/K_2)} - r_{resp} \quad \text{(Equation 3)}$$

rO_2 est la production d'O₂ (nmol.mL⁻¹.min⁻¹)

rO_{2max} est la production maximale d'O₂ (nmol.mL⁻¹.min⁻¹)

r_{resp} est la consommation d'O₂ (nmol.mL⁻¹.min⁻¹)

G est l'irradiance ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.)

K_1 et K_2 sont des constantes évaluées expérimentalement.

La courbe de température est obtenue en utilisant l'équation de Roels (1983) (Equation 4). Pour déterminer ce paramètre l'irradiance a été fixée à 600 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

$$\frac{r_{O_2}}{r_{O_2max}} = \frac{Ae^{-\left(\frac{\Delta h_E^*}{RT}\right)}}{1 + Be^{-\left(\frac{\Delta h_D^*}{RT}\right)}} \quad (\text{Equation 4})$$

Δh_D^* est l'enthalpie de désactivation (J.mol^{-1})

Δh_E^* est l'enthalpie d'activation (J.mol^{-1})

R est la constante universelle des gaz parfaits ($8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)

T est la Température absolue (K)

A et B sont des constantes évaluées expérimentalement

1.5. Quantification de la biomasse

1.5.1. Comptage sur cellule de Malassez

La croissance cellulaire des microalgues est déterminée par comptage en utilisant une cellule de Malassez après un éventuel prétraitement rendu nécessaire si la biomasse forme des agrégats. Dans ce cas, les cellules sont soumises à des ultrasons (sonicateur U50 control, IKA® Labortechnik) à 20% d'amplitude (10 W) sous 5x2 cycles de 2 s. Les microalgues sont ensuite comptées sur 10 carrés de 0,01 μL et la concentration cellulaire est rapportée en nombre de cellules par mL. Tous les comptages sont réalisés en triplicat.

1.5.2. Masse sèche

Pour quantifier massiquement les biomasses de microalgues, 5 à 10 mL de culture sont filtrés à l'aide d'une pompe à vide sur un filtre de 0,22 μm . Après la filtration, le filtre est séché à 110°C pendant 16 à 72 h jusqu'à stabilisation de la masse (pesée). Dans certains cas, la biomasse retenue sur le filtre a été lavée avec de l'eau ultra pure 3 fois afin d'éliminer la fraction polysaccharidique hydrosoluble.

1.6. Culture des microalgues

1.6.1. Culture en Erlenmeyers

Les microalgues (genres *Porphyridium* et *Rhodella*) sont cultivées en fioles Erlenmeyer de volumes variables (50 à 2000 mL) contenant 50% de leur volume total en milieu de culture correspondant. Après inoculation à raison de 10% du volume final de milieu de culture, les fioles sont entreposées dans un incubateur à 24°C, sous agitation à 130 rpm. La source de

Matériels et Méthodes

lumière est fournie par deux lampes ($100 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), avec un cycle jour/nuit de 16/8h.

1.6.2. Culture en photobioréacteurs

Les cultures en photobioréacteurs sont inoculées à 10% de leurs volumes utiles avec une culture de microalgues contenant $1,6.10^5$ cellules. mL^{-1} . L'inoculum est issu d'une culture en Erlenmeyer en phase exponentielle de croissance.

1.6.2.1. Photobioréacteur de 600 mL

Les fioles de Roux sont utilisées comme des “mini-photobioréacteurs” conçus au laboratoire pour la culture de microalgues.

Les photobioréacteurs sont constitués d'une fiole de Roux de 700 mL thermorégulée par une double enveloppe en verre. La culture est agitée grâce à un barreau aimanté à 200 rpm. Un système d'éclairage constitué de 3 lampes halogènes (Sylvania professional 25, BAB 38°, 12 V, 20 W) connectées à un générateur à tension variable (comprise entre 0 et 5 V) est disposé à 10 cm des fioles. La variation de tension permet de générer des irradiances comprises entre 0 et $600 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Un circuit d'air stérile avec des débitmètres massiques, permet de contrôler le débit (100 à $200 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$) et la composition de l'air (1% de CO_2) entrant dans les fioles. Le volume de culture est de 660 mL.

1.6.2.2. Photobioréacteur de 5 L

Les microalgues sont cultivées dans un photobioréacteur cylindrique de 5L à éclairage radial externe (Figure 38). L'éclairage est constitué de 55 lampes halogènes (Sylvania professional 25, BAB 38°, 12 V, 20 W). L'irradiance est réglée via un générateur de tension variable.

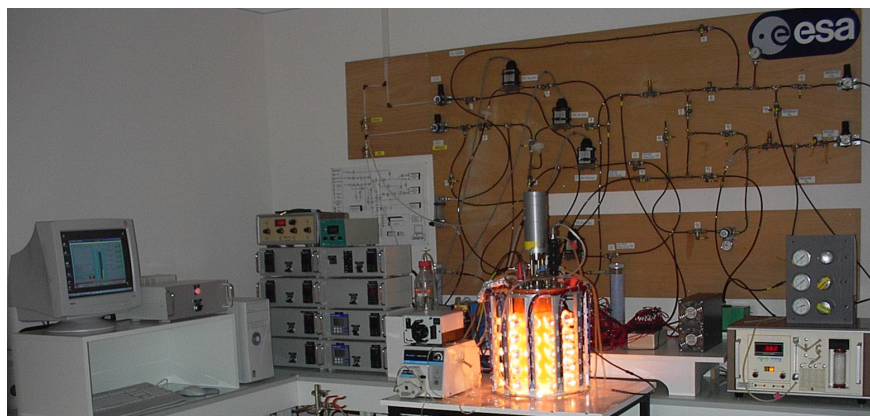


Figure 38 Photobioréacteur et périphériques de régulation.

Matériels et Méthodes

Le photobioréacteur est équipé d'une sonde de température, d'une sonde à pression partielle de dioxygène dissous et d'une sonde de pH. Le contrôle de la température (circulation de fluide thermorégulé) est assuré par le logiciel ETP-200 V3.0. Un circuit de prélèvement permet le suivi des cultures. Le photobioréacteur est équipé d'un condensateur thermorégulé (4°C) pour éviter l'évaporation du milieu de culture par entraînement. Le pH est régulé par modification du taux de CO₂ dans l'air (de 1 à 2%) injecté dans le réacteur à un débit de 100 mL.min⁻¹. L'agitation est fixée à 200 rpm.

1.7. Techniques de Biologie Moléculaire

1.7.1. Extraction de l'ADN

Le ribosome des cellules eucaryotes est constitué de deux sous unités (60S et 40S).

La grande sous unité 60S est composée de trois ARNr :

- 5,8 S
- 5 S + 40 protéines ribosomiques
- 28 S

La petite sous unité 40S contient l'ARNr 18S et 30 protéines ribosomiques.

La séquence codante pour l'ARNr 18S contient 2500 nucléotides (Figure 39).

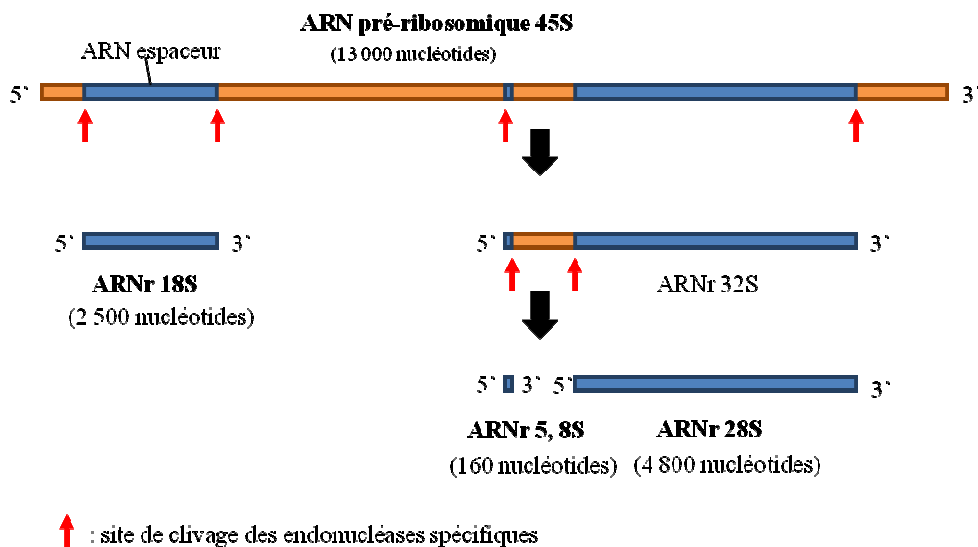


Figure 39 Séquence de l'ADN du gène codant pour l'ARN pré-ribosomique 45S.

L'ADN est extrait de 2 mL de culture de *Rhodella violacea* contenant $2,01 \cdot 10^5$ cellules.mL⁻¹. La biomasse est centrifugée (16000 g, 1 min, 20 °C) puis l'ADN est extrait du culot contenant les cellules comme décrit par Fawley et Fawley (2004).

Matériels et Méthodes

Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 540 μL de milieu BG 11 (composition partie II.1.2), puis centrifugé à nouveau (16000 g, 1 min, 20 °C). Après élimination du surnageant, le culot est repris avec 560 μL de tampon Tris-EDTA (TE, pH 8, 10 mM de Tris base et 1 mM d'EDTA) et 7 μL de lysozyme (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Après 30 min à 37°C, du SDS et des protéinases K sont ajoutés pour obtenir des concentrations finales de respectivement 0,5% et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Le mélange est laissé 60 min à 37°C, puis du NaCl (5 M) et du CTAB/NaCl (100 g.L^{-1} /41 g.L^{-1}) sont ajoutés pour obtenir des concentrations finales de 0,7 M et 1% (m/v) respectivement. Le mélange est incubé 10 min à 65°C. Un volume d'un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 :1) est ajouté. L'ensemble est centrifugé (14 000 g, 30 min, 4°C) puis le surnageant est récupéré et 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1) est ajouté avant une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions. Le surnageant est collecté et 0,6 volume d'isopropanol y sont ajoutés. Le mélange est laissé une nuit à 20°C. La suspension est centrifugée (14 000 g, 30 min, 4°C) et le surnageant est éliminé. Enfin le culot contenant l'ADN est lavé avec de l'éthanol 70% (v/v). Le mélange est centrifugé (14 000 g, 20 min, 4°C). Le surnageant est éliminé puis le culot est séché sous vide (speed Vac), et l'ADN est remis en suspension dans 50 μL de tampon TE. L'ADN est conservé 1 nuit à 4°C avant d'être amplifié.

1.7.2. Techniques d'amplification de l'ADN

L'ADN codant pour l'ARNr 18S a été amplifié à l'aide de primers eucaryotes universels (Euk-1F et Euk-1520R) par PCR (Lefranc *et al.*, 2005).

Les séquences des primers sont les suivantes :

Euk-1F (CTGGTTGATCCTTGCCAG)

Euk-1520R (CYGCAGGTTCACCTAC)

L'amplification PCR est réalisée avec 0,2 mM de deoxynucléosides triphosphates, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 μM de chaque primer, et 1,5 U de *Taq* DNAPolymérase Bioline (Abcys).

Matériels et Méthodes

La PCR se déroule sur 1 cycle de dénaturation initiale de 3 min à 94°C suivi par 35 cycles de 3 min :

- 1 min à 95°C, pour dénaturer les ADN
- 1 min à 56°C, pour l'hybridation
- 1 min à 72°C pour l'élongation de l'ADN

Enfin une phase d'extension finale de 10 min à 72°C est réalisée.

Le fragment d'ADN amplifié est purifié avec un kit ExoSAP-IT (Affymetrix).

Le fragment d'ADN 18S amplifié est analysé par électrophorèse en gel d'agarose (1% dans du tampon TAE : Tris, Acétate, EDTA) contenant du Bromure d'Etidium ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) afin de vérifier l'absence d'amplifications parasites. Le gel est déposé dans un tampon de migration TAE 1X (Tris 40 mM, acide acétique 80 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3). La migration s'effectue à 10 V.cm^{-1} de gel. L'échantillon d'ADN est mélangé avec un tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, glycérol 40%) puis il est déposé sur gel. Un standard de masses moléculaires est déposé à proximité de l'échantillon pour pouvoir estimer la taille du fragment d'ADN.

1.7.3. Séquençage de l'ADN

Les séquences des fragments d'ADN sont déterminées à l'aide de dideoxynucleotides fluorescents (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, Calif) et d'un séquenceur automatique (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer). Les séquences obtenues sont reconstituées avec un logiciel d'assemblage automatique (version 1.4 ; Perkin-Elmer). La séquence partielle du gène codant l'ARNr 18S de *R. violacea* a été déposée dans la banque GenBank data library sous le numéro d'accension KC515354.

1.7.4. Analyse et comparaison de séquences

La séquence d'ADN obtenue est comparée avec d'autres séquences d'ADN 18S de microorganismes afin de déterminer la filiation de la microalgue. L'alignement des séquences est réalisé avec MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2005). Le logiciel permet de définir les distances entre les séquences et de construire l'arbre phylogénétique. La séquence d'ADN codant l'ARNr 18S de la microalgue *Rhodella violacea* a été comparée à celles de différentes microalgues : *Rhodella sp.* (Accession Nos. AB045580.1, GU191839.1, AB183648.1), *Porphyridium sp.* (Accession Nos. AJ421145.1, AB045584.1, FJ595490.2) et *Cyanidium caldarium* SAG16.91 (Accession No. AB091231.1).

2. Les techniques d'analyse

2.1. Extraction des exopolysaccharides

2.1.1. Polysaccharides de microalgues

Les polysaccharides extracellulaires solubles sont séparés de la biomasse par centrifugation (10 000 g, 30 min, 15°C). Le surnageant est ensuite concentré deux fois par évaporation sous vide (72 mBars, 60°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi Technology). Le milieu concentré est dialysé (membranes en cellulose régénérée, de seuil de coupure de 10 000 Da) contre de l'eau ultra pure, dans 4 à 9 bains (5L) jusqu'à stabilisation de la conductivité (conductimètre CDC641T 2 pôles, Radiometer Analytical) dans le dialysat. La solution de polysaccharide dialysée est congelée à -80°C puis le polysaccharide est séché par lyophilisation. Le polysaccharide sec est stocké en flaconnage à température ambiante.

2.1.2. Polysaccharides de macroalgues

Pour les tests d'activité biologique antiparasitaire, plusieurs polysaccharides de macroalgues ont été testés : deux iota-carraghénanes commerciaux (C1 fourni par Rhodia, et C3 « aquagel » produit par Ikeda), 4 polysaccharides extraits de macroalgues rouges (*Halymenia durvillei*, *Eucheuma cottonii*, *Gracillaria sp.* et *Gracillaria caniculata*) et un autre issu de macroalgue verte, *Ulva lactuca*.

Trois des macroalgues rouges (*Halymenia durvillei*, *Gracillaria sp.* et *Gracillaria caniculata*) ont été récoltées sur la côte de l'île de Nosy-Be dans l'océan indien (Madagascar) en août 2006. Les thalles ont été nettoyés manuellement à l'eau de mer afin d'éliminer les épiphytes puis séchés à l'air libre pendant environ 36 h. La dernière macroalgue rouge (*Eucheuma cottonii*) a été fournie par la société Rhodia.

Le polysaccharide d'*Halymenia durvillei* a été extrait et purifié selon le protocole décrit par Fenoradosoa *et al.*, (2009). Vingt-cing grammes d'algues sèches sont chauffés au bain marie dans 250 mL d'eau milli-Q à 90°C pendant 4 h. Le mélange est ensuite dilué avec 250 mL d'eau milli-Q à 90°C et filtré avec une passoire pour éliminer les débris macroscopiques d'algues. La solution est ensuite filtrée sous vide à l'aide de verres frittés de porosité 1, 2 et 3 (101-160 µm ; 41-100 µm ; 17-40 µm respectivement). Enfin, le filtrat obtenu est centrifugé à 12 000 g pendant 30 min et est précipité par 3 volumes d'éthanol à 96 % froid (4°C). Cette

Matériels et Méthodes

opération est répétée 3 fois pour éliminer le maximum de contaminants. Le précipité est lyophilisé après avoir été remis en solution dans de l'eau milli-Q.

Pour les polysaccharides extraits d'*Eucheuma cottonii*, *Gracillaria sp.* et *Gracillaria caniculata*, un protocole d'extraction en conditions alcalines a été appliqué. Vingt-cinq grammes d'algues sèches sont chauffés au bain marie dans 250 mL d'une solution de NaOH à 0,2 M à 90°C pendant 4 h. Le mélange obtenu est ensuite dilué avec 250 mL d'eau milli-Q à 90°C et filtré avec une passoire pour éliminer les débris macroscopiques d'algues. La solution est filtrée sous vide à l'aide de verres frittés de porosité 1, 2 et 3 (101-160 µm ; 41-100 µm ; 17-40 µm respectivement). Enfin, le filtrat obtenu est centrifugé à 12 000 g pendant 30 min et est précipité par 3 volumes d'éthanol à 96 % froid (4°C). Cette opération est répétée 3 fois pour éliminer le maximum de contaminants. Le précipité est lyophilisé après avoir été remis en solution dans de l'eau milli-Q.

Le polysaccharide d'*Ulva lactuca* a été extrait en conditions acides selon la méthode décrite par Lahaye *et al.*, en 1999, à partir de pailletes d'algues sèches fournies par la société Agrimer. Dix grammes d'algues sèches sont mises en suspension dans 500 mL d'une solution d'acide sulfurique à 0,03 M, et agitées pendant 30 minutes. Le mélange est filtré sur une membrane en nylon de porosité 0,2 mm. Le résidu est repris par 500 mL d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃) à 0,1 M et porté à ébullition pendant 30 minutes avant d'être centrifugé (6000g, 15 min) et filtré sur une membrane en nylon de porosité 1,2 µm. La solution est alors concentrée deux fois (Rota Vapor®, 72 mbar, 60°C), avant d'être précipité par 3 volumes d'éthanol et centrifugé (15000g, 15 min). Cette opération est répétée 3 fois pour éliminer le maximum de contaminants. Le précipité est lyophilisé après avoir été remis en solution dans de l'eau milli-Q.

2.2. Dosages colorimétriques

2.2.1. Dosage des nitrates

Les nitrates sont la source d'azote des microalgues dans les milieux de culture étudiés. Le suivi de leur concentration permet de prévoir l'entrée en phase stationnaire des microalgues, et donc la production de polysaccharides.

La détermination des nitrates est réalisée par la méthode de Cawse (1967) modifiée selon *American Public Health Association* (A.P.H.A. 1971). L'absorbance des solutions à 210 nm et 275 nm s'effectue dans des cuves en quartz.

Matériels et Méthodes

La mesure de l'absorbance à 210 nm permet une détermination rapide de la teneur en ions NO_3^- qui absorbent à cette longueur d'onde. Pour éliminer les interférences dues aux protéines les échantillons sont traités à l'acide perchlorique et leur absorbance à 275 nm est prise en compte dans la détermination de la teneur en nitrates.

Une gamme étalon de nitrate de sodium est réalisée entre 0 et 0,1 g.L⁻¹ à partir d'une solution mère de nitrate de sodium (NaNO_3) à 0,5 g.L⁻¹.

3,6 mL d'acide perchlorique à 5% (m/m, 0,84 M) sont mélangés avec 400 µL d'échantillon. L'absorbance est mesurée immédiatement après mélange (vortex) à 210 et 275 nm. (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu).

Pour connaître la quantité de nitrates, on applique la relation suivante :

$$DO_{\text{réel}} = DO_{210} - 2x(DO_{275} - \overline{DO}_{\text{Gamme } 275}) \quad (\text{Equation 5})$$

Avec DO_{210} : absorbance de l'échantillon à 210 nm

DO_{275} : absorbance de l'échantillon à 275 nm

$DO_{\text{Gamme } 275}$: absorbance moyenne de la gamme étalon à 275 nm

Les DO réelles obtenues sont reportées sur la gamme étalon et permettent de déterminer la concentration en nitrate de la solution analysée.

2.2.2. Dosage des protéines

2.2.2.1. Méthode de Bradford

La méthode de Bradford (1976) est un dosage colorimétrique, basé sur le changement de couleur du bleu de Coomassie lorsqu'il se complexe avec les acides aminés basiques, (arginine, histidine, lysine) et les acides aminés hydrophobes présents dans les protéines. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouge-marron. La forme anionique du réactif correspond à la forme liée avec les protéines. L'absorbance de ce complexe est mesurée à 595 nm. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

Une gamme étalon comprise entre 0 et 1 mg.mL⁻¹ est réalisée avec une solution mère de sérum albumine bovine (SAB) à 1 mg.mL⁻¹.

Le réactif de Bradford (BIO-RAD) est dilué au 1/5^{ème}, avec de l'eau milli Q stérile, agité puis filtré sur filtre plissé. Le réactif dilué est stocké à l'obscurité à 4°C où il se conserve 3 semaines. 100 µL d'échantillon sont mélangés avec 5 mL de réactif de Bradford. La solution

Matériels et Méthodes

est incubée 30 min à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance est lue à 595 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu).

Les acides aminés, les peptides et les protéines de faible masse moléculaire (< 3 000 Da) ne sont pas détectés par cette méthode.

2.2.2.2. Méthode de Lowry

La méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) est plus sensible que le dosage de Bradford.

Les échantillons sont préalablement traités avec un réactif cuivrique alcalin (réactif de Lowry) avant de réagir avec le réactif phosphotungstomolybdique (réactif de Folin). Le réactif de Folin est composé de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique (Folin & Ciocalteu's phenol reagent : Sigma Aldrich). Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane), conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on peut mesurer l'absorbance à 750 nm.

Pour former le réactif de Lowry, 3 solutions sont préparées séparément puis mélangées avant utilisation avec un ratio, solutions A : B : C de 100 : 1 : 1.

Solution A : Solution alcaline

- NaOH 2,86 g
- Na₂CO₃ 14,31 g
- Eau ultra pure qsp 500 mL

Solution B

- CuSO₄.5H₂O 1,42 g
- Eau ultra pure qsp 100 mL

Solution C :

- Na₂tartrate.2H₂O 2,85 g
- Eau ultra pure qsp 100 mL

Le réactif de Folin est préparé juste avant utilisation en diluant 5 mL de réactif dans 6 mL d'eau ultra pure. La gamme étalon est réalisée de 0 à 0,1 mg.mL⁻¹ avec une solution mère de SAB à 0,1 mg.mL⁻¹.

Matériels et Méthodes

Cinq cent μL d'échantillon sont mélangés à 700 μL de réactif de Lowry puis incubés 20 min à température ambiante à l'obscurité. Au terme des 20 min, 100 μL de réactif de Folin dilué sont ajoutés au mélange réactionnel avant de laisser les tubes incuber à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. La DO est mesurée à 750 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu).

2.2.3. Dosage des acides uroniques et des oses neutres

Les liaisons glycosidiques subissent une hydrolyse, à chaud, en présence d'acide sulfurique. La déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de composés furfuriques. Ces derniers interagissent avec les composés phénoliques (résorcinol ou méta-hydroxybiphényle) par condensation pour former des composés absorbant à 450 ou 520 nm (Blumenkrantz et Asbee-Hansen, 1973; Monsigny *et al.*, 1988).

Deux gammes étalons sont réalisées, une gamme étalon de glucose pour les oses neutres et une gamme étalon d'acide glucuronique pour les acides uroniques avec des concentrations en oses comprises entre 0,05 et 0,3 g.L^{-1} .

2.2.3.1. Dosage des oses neutres

Une solution de résorcinol à 6 g.L^{-1} est préparée avec de l'eau ultra pure pour doser les oses neutres. La solution est stable pendant un mois lorsqu'elle est conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

Mélanger dans des tubes:

- 200 μL d'échantillon
- 200 μL de résorcinol
- 1 mL d'acide sulfurique 80% (m/v)

Les tubes sont incubés à 90°C pendant 30 min, puis 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière.

Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec 1,4 mL d'eau ultra pure et son absorbance est mesurée à 450 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu).

2.2.3.2. Dosage des oses acides

Deux réactifs sont nécessaires au dosage des oses acides : une solution de Borax et une solution de méta-hydroxybiphényle (m-HBP).

Matériels et Méthodes

La solution de borax (0,12 M) est préparée en solubilisant 22,88 g de borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) dans 500 mL d'acide sulfurique 96 % (m/v) pendant 16 h à 4°C à l'abri de la lumière. Elle est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Une solution de méta-hydroxybiphényle (m-HBP) est préparée en solubilisant 100 mg de m-HBP dans 1 mL de DMSO. La solution est stockée à 4°C à l'abri de la lumière. Juste avant utilisation 102 μL de la solution sont dilués dans 5 mL d'acide sulfurique 80% (m/v) (la solution se colore progressivement en jaune puis vire au rose).

Pour chaque essai, mélanger dans un tube :

- 200 μL d'échantillon
- 1 mL de la solution de borax

Les tubes sont incubés à 90°C pendant 1h. Immédiatement après cette incubation ajouter 200 μL de la solution de m-HBP/acide sulfurique et agiter. Mesurer l'absorbance à 520 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu).

2.2.3.3. Correction des interférences des oses neutres/osés acides.

Lors du dosage des polysaccharides, il existe des interférences entre les oses neutres et les oses acides qui entraînent des erreurs de quantification. Ces erreurs sont corrigées à partir du tracé des gammes étalon ($\text{DO} = f(\text{concentration}) (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$) par la méthode de Montreuil et Spik (1963).

- α : pente de la gamme étalon ON (glucose) pour le dosage des oses neutres
- β : pente de la gamme étalon OA (ac glucuronique) pour le dosage des oses neutres
- α' : pente de la gamme étalon ON pour le dosage des oses acides
- β' : pente de la gamme étalon OA (ac glucuronique) pour le dosage des oses acides

$$\text{DO résorcinol} = \alpha [\text{ON}] + \beta [\text{OA}] \text{ et } \text{DO m-HBP} = \alpha' [\text{ON}] + \beta' [\text{OA}] \approx \beta' [\text{OA}]$$

(La concentration en oses neutres est négligeable lors du dosage des oses acides)

$$\Rightarrow [\text{ON}] = [\text{DO résorcinol} - (\beta (\text{DO m-HBP} / \beta'))] / \alpha$$

$$\Rightarrow [\text{OA}] = \text{DO m-HBP} / \beta'$$

2.2.4. Dosage des oses totaux par la méthode de Dubois

La quantité d'oses totaux contenue dans le surnageant des milieux de culture des microalgues est suivi en utilisant la méthode de dosage colorimétrique de Dubois *et al.*, (1956) utilisant le phénol et l'acide sulfurique. Ce dosage se réalise dans les mêmes conditions que le dosage des oses neutres décrit ci-dessus. Les liaisons glycosidiques sont hydrolysées, à chaud, en présence d'acide sulfurique concentré et la déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de composés furfuriques. Ces derniers interagissent avec les composés phénoliques (phénol) par condensation pour former des composés de coloration orange-jaune absorbant à 492 nm.

Une gamme étalon de glucose est réalisée avec des concentrations en oses comprises entre 0,05 et 0,3 g.L⁻¹. Une solution de phénol à 5% (m/v) est préparée avec de l'eau ultra pure.

Mélanger dans des tubes :

- 200 µL d'échantillon
- 200 µL de phénol
- 1 mL d'acide sulfurique 80% (m/v)

Les tubes sont incubés à 90°C pendant 5 min, puis ils sont laissés 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 492 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu).

2.2.5. Dosage des sulfates

Le degré de sulfatation des polysaccharides a été déterminé par la méthode turbidimétrique au BaCl₂/gélatine (Dodgson et Price, 1962).

150 mg de gélatine sont dissous dans 50 mL d'eau ultra pure à 70°C. Après refroidissement 16 h à 4°C, la solution de gélatine est additionnée de 0,5 g de BaCl₂.2H₂O.

Le polysaccharide à analyser (120 mg) est hydrolysé par de l'acide chlorhydrique 2M (3 mL) pendant 2h à 100°C. L'hydrolysate est ensuite centrifugé à 13 000 g pendant 30 min à 20°C. Un mL de surnageant est mélangé à 9 mL d'eau ultra pure, 1 mL d'HCl à 0,5 M et 0,5 mL de réactif BaCl₂/gélatine. Les ions sulfates libérés lors de l'hydrolyse des polysaccharides vont former, en présence de chlorure de baryum et de gélatine, un précipité de sulfate de baryum. Après 30 min à température ambiante, le mélange est agité et l'absorbance est lue immédiatement à 550 nm. Une gamme étalon de sulfate de potassium (K₂SO₄) de 0,5 à 3 mg.mL⁻¹ est réalisée à l'aide d'une solution mère à 3 mg.mL⁻¹.

2.3. Caractérisation structurale des exopolysaccharides

2.3.1. Désulfatation des exopolysaccharides

Les polysaccharides sont modifiés sous forme de sels de pyridinium (Falshaw et Furneaux, 1998). Dix mg de polysaccharides sont dissous dans 2,5 mL d'eau ultra pure. Le mélange est ensuite dialysé (seuil de coupure 10 000 daltons) contre du chlorhydrate de pyridinium 0,1 M à pH 6,8 (3 échanges sur 48 h) puis contre de l'eau ultra pure (2 échanges) avant d'être lyophilisé.

Les sels de pyridinium des polysaccharides obtenus sont dissous à 2,5 mg.mL⁻¹ dans un mélange DMSO-Méthanol-Pyridine (89 : 10 : 1, v/v/v) puis chauffés à 100°C au bain marie pendant 4h dans un tube fermé hermétiquement. Après retour à la température ambiante, le mélange est dialysé (3 échanges) contre de l'eau ultra pure (seuil de coupure 3 500 Da).

2.3.2. Composition en monosaccharides des polysaccharides.

2.3.2.1. Identification des monosaccharides par chromatographie ionique

La chromatographie échangeuse d'anions haute performance (CEAHP) a été utilisée pour identifier et quantifier les monosaccharides constitutifs des polysaccharides après hydrolyse acide. La chromatographie ionique utilisée dans cette étude est de type ICS 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale (CA), USA). Elle est composée d'un injecteur automatique AS40, d'un module de pompe pouvant fonctionner en gradient et d'un détecteur ampérométrique pulsé (CEAHP-DAP). L'acquisition et le traitement des données sont réalisés par le logiciel Chromeleon (version 6.8).

Les échantillons sont filtrés à 0,22 µm puis élués dans une pré-colonne et une colonne CarboPac PA1 (Dionex, respectivement 4 x 50 mm; et 4 x 250 mm). La phase stationnaire est une résine échangeuse d'anions qui va permettre de séparer les molécules anioniques. Cette phase est constituée de billes de polystyrène et de divinylbenzène de 10 µm de diamètre, sur lesquelles sont agglomérées des particules fonctionnalisées par des groupements ammonium quaternaire (NR₄⁺). Ce type de phase stationnaire peut supporter des pressions de 4 000 psi (275 bars) dans une large gamme de pH (de 0 à 14).

Les monosaccharides issus d'hydrolysats de polysaccharides (ou de monosaccharides standards : L-Rha, D-Rib, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GlcA, D-GalA) sont

Matériels et Méthodes

transformés dans la phase mobile en alcoolates à des pH supérieurs au pKa de leurs fonctions hydroxyles ($\text{-OH} \rightarrow \text{-O}^-$). La phase mobile est constituée d'un gradient d'acétate de sodium et d'hydroxyde de sodium à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Tableau 6, Figure 40).

Tableau 6 Gradient utilisé en CEAHP pour l'analyse des monosaccharides neutres et acides

Temps (min)	Hydroxyde de sodium (NaOH) 200 mM	Acétate de sodium (CH_3COONa) 1M Hydroxyde de sodium (NaOH) 200 mM	Hydroxyde de sodium (NaOH) 18 mM	Eau ultra pure
-5	0	0	100%	0
30	0	0	100%	0
30	30%	10%	0	60%
50	50%	50%	0	0
51	0	100%	0	0
70	0	100%	0	0
71	100%	0	0	0
85	100%	0	0	0
86	0	0	100%	0
92	0	0	100%	0

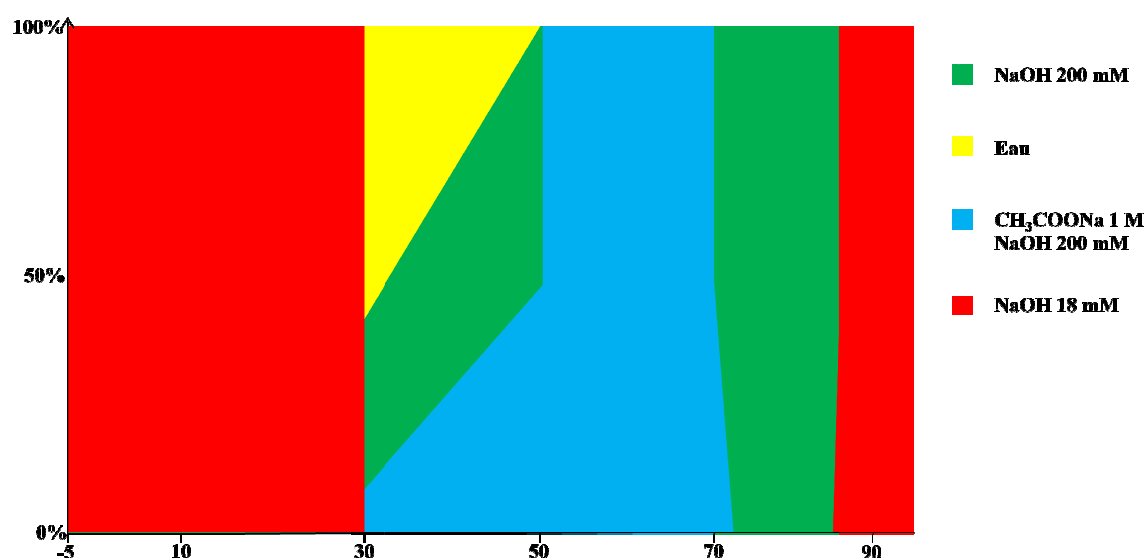


Figure 40 Gradient d'élution des monosaccharides en CEAHP.

Lorsque les monomères sont élués de la colonne, ils sont oxydés à la surface d'une électrode en or. L'oxydation génère un courant électrique proportionnel à la concentration en analytes ce qui rend l'analyse quantitative. Le potentiel appliqué à l'électrode, génère des produits d'oxydation qui abîment sa surface. Afin de prévenir la diminution du signal, la surface de

Matériels et Méthodes

l'électrode est nettoyée par l'application d'une série de potentiels pendant des périodes fixées après le potentiel de détection (ampérométrie pulsée).

Une gamme d'étalons externes puis l'ajout d'un étalon interne dans l'échantillon à analyser permet d'estimer qualitativement et quantitativement la composition en monosaccharides des hydrolysats de polysaccharides.

Les hydrolysats de polysaccharides sont obtenus sous différentes conditions afin de trouver la méthode optimale d'hydrolyse pour un polysaccharide donné.

Hydrolyse à l'acide sulfurique (H_2SO_4).

Dix mg de polysaccharides sont mélangés avec 125 μ L d' H_2SO_4 (14 M). Le mélange est incubé 45 minutes à température ambiante puis 1,35mL d'eau ultra pure sont ajoutés afin d'avoir une concentration d' H_2SO_4 de 1M. Le mélange est maintenu 3h à 100°C. Au terme de ces 3h, les hydrolysats sont neutralisés avec de l'ammoniaque 16,5 M, après retour à température ambiante.

Hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (ATF).

Deux hydrolyses différentes sont réalisées avec l'ATF.

La première méthode utilise 10 mg de polysaccharides mélangés à 1 mL d'ATF 4 M. L'hydrolyse se déroule pendant 8h à 100°C. La seconde méthode nécessite 20 mg de polysaccharides mélangés à 3 mL d'ATF 9 M. La réaction a lieu pendant 3h à 100°C.

Hydrolyse à l'acide chlorhydrique 2M.

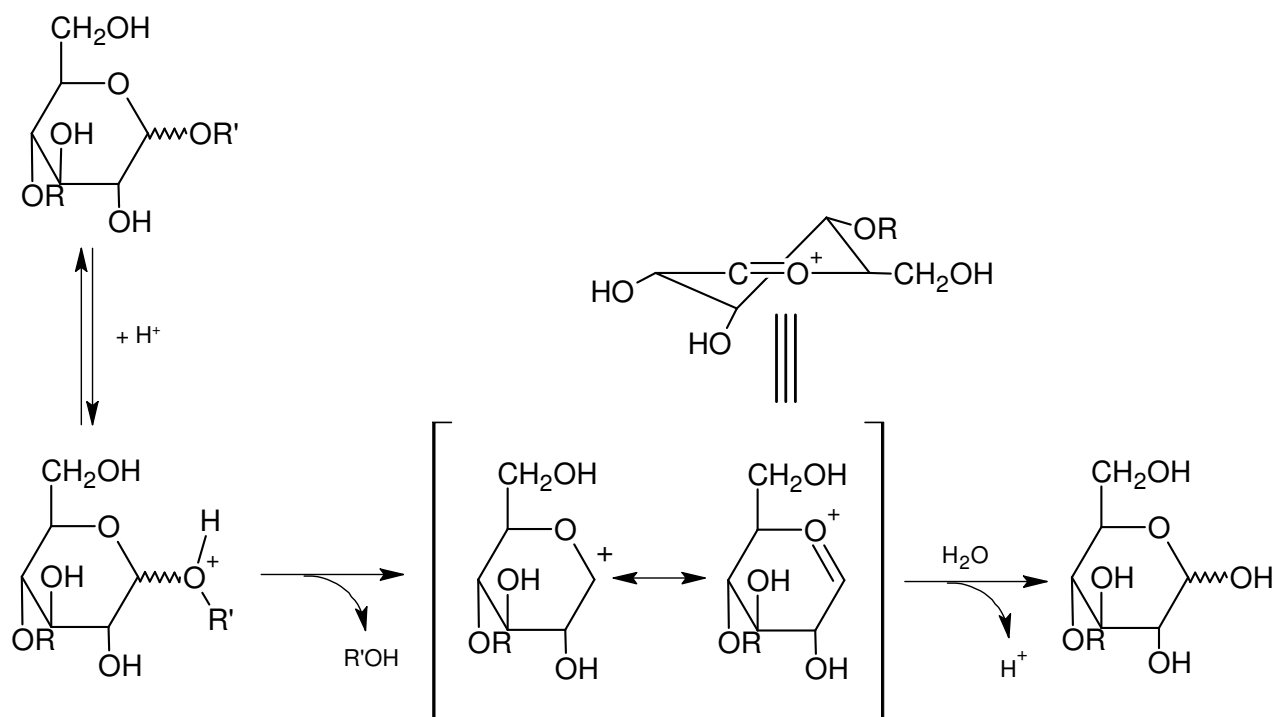
Dix mg de polysaccharides sont mélangés avec 2 mL d'acide chlorhydrique 2M. L'hydrolyse est maintenue pendant 2h à 100°C. Les hydrolysats sont neutralisés avec de l'ammoniaque à 16,5 M, après retour à température ambiante.

2.3.2.2. Identification des monosaccharides par Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

La chromatographie en phase gazeuse permet la séparation, l'identification, et la quantification de monosaccharides constitutifs de polysaccharides après dépolymérisation. La CPG permet de visualiser les différents anomères osidiques présents dans un mélange, en équilibre mutarotationnel. Ainsi les formes furanes et pyranes (alpha et bêta) sont potentiellement identifiables.

2.3.2.2.1. Hydrolyse des polysaccharides

Le choix de la méthode d'hydrolyse est important. Selon la technique d'hydrolyse employée la stabilité des monomères est différente, et elle varie d'un monomère à l'autre. Le mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides a été précisément décrit par BeMiller (1967) (Figure 41).



R, R' = Aglycone ou chaîne glucidique

Figure 41 Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides, d'après BeMiller (1967).

Il faut noter que les acides uroniques sont particulièrement résistants à l'hydrolyse acide, de part la stabilité de la liaison uronosidyle à pH acide (Timell *et al.*, 1965) (Figure 42). Certains auteurs ont également observé l'élimination de certains acides uroniques au cours d'étapes de méthylation (Dubreucq, 1996). L'analyse des acides uroniques par CPG est donc particulièrement délicate et nécessite souvent la réduction préalable des monosaccharides sous forme de polyols.

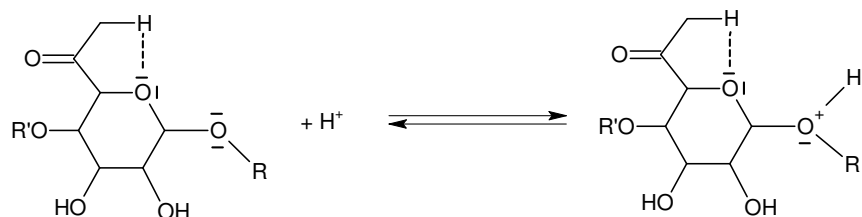


Figure 42 Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell *et al.*, (1965).

Après libération des résidus glycosidiques par dépolymérisation acide, l'analyse des monosaccharides a été réalisée sous la forme (i) de glycosides-O-triméthylsilylés, (ii) de méthylglycosides-O-triméthylsilylés et (iii) d'acétates d'alditols.

Hydrolyse des polysaccharides à l'acide chlorhydrique.

10 mg de polysaccharides sont hydrolysés par 2 mL d'acide chlorhydrique 2 M pendant 3 à 4 h (selon la richesse en acides uroniques) à 90°C. L'hydrolysats est ensuite évaporé sous jet d'azote pendant 1 h. Ces échantillons alimentent le protocole de triméthylsilylation directe.

2.3.2.2.2. Triméthylsilylation des monosaccharides

La triméthylsilylation des monosaccharides est la réaction nécessaire à la volatilisation des monomères constitutifs des polysaccharides afin de pouvoir les analyser en CPG. La triméthylsilylation directe est réalisée entre les glycosides et du *N,O*-bis-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) 99% (v/v) stabilisé par du triméthylchlorosilane (TMCS) 1% (v/v) en milieu fortement alcalin (pyridine). La méthode utilisée est adaptée de la méthode de Kamerling *et al.*, (1975) modifiée par Montreuil *et al.*, (1986) pour les résidus méthanolysés (O-méthylglycosides) (Figure 43).

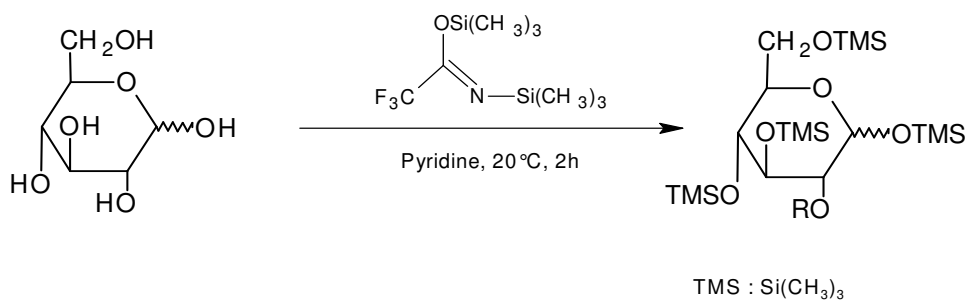


Figure 43 Triméthylsilylation des O-méthylglycosides d'après Kamerling *et al.*, (1975).

Matériels et Méthodes

Dix mg de monosaccharides issus d'une hydrolyse acide (ou de monosaccharides standards : L-Rha, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GlcA, D-GalA) sont triméthysilylés en ajoutant 400 µL de *N,O*-bis(triméthysilyl) trifluoroacétamide : triméthylchlosylane (BSTFA: TMCS, 99 : 1) et 400 µL de pyridine. La solution est incubée 2 heures sous agitation à température ambiante. Les réactifs en excès sont ensuite évaporés sous jet d'azote puis les glycosides-O-triméthysilylés sont repris dans un volume variable de dichlorométhane avant d'être analysés en CPG. Plusieurs pics seront observables pour un même monosaccharide dérivé, traduisant une évolution de l'équilibre mutarotationnel pendant la phase d'hydrolyse acide.

Méthanolyse des polysaccharides et triméthysilylation.

La méthanolyse est une méthode efficace d'hydrolyse des polysaccharides qui permet d'appuyer les résultats obtenus par triméthysilylation directe. Cette méthode entraîne une faible dégradation des monosaccharides, avec une conversion quasi-totale des monomères en méthylglycosides (Chambers *et al.*, 1971). Toutefois, les acides uroniques sont souvent éliminés au cours du processus.

Deux mg d'échantillon sont mélangés avec 3 mL de méthanol/acide chlorhydrique 2 M dans un tube hermétique puis incubés au bain marie sec 16 h à 80°C. Après retour à température ambiante, les solvants en excès sont évaporés sous jet d'azote. Le culot contenant les méthylglycosides est ensuite triméthysilylé en utilisant la méthode de triméthysilylation directe. Au final, les méthylglycosides-O-triméthysilylés sont repris dans un volume variable de dichlorométhane avant d'être injectés en CPG. Tout comme précédemment, plusieurs pics secondaires sont observables pour un même monosaccharide et correspondent aux autres formes anomériques (alpha et bêta, cycle pyranique et furanique).

Formation d'acétates d'alditols.

Cette méthode à l'avantage, par rapport aux méthodes de triméthysilylation, de faire apparaître chaque monosaccharide sous la forme d'un pic unique, levant toute ambiguïté sur leur identification. Les monosaccharides constitutifs sont transformés en alditols avant d'être acétylés selon une méthode adaptée de Harris *et al.*, (1984) (Figure 44).

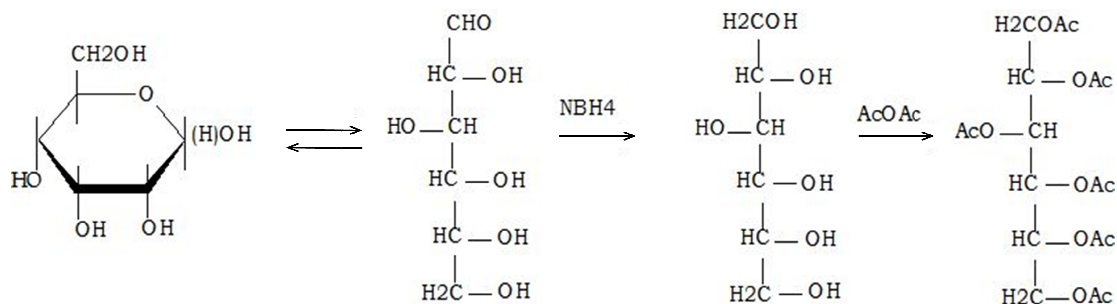


Figure 44 Formation d'acétates d'alditol (Urbani *et al.*, 2012).

Deux g de tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) sont dissous dans 100 mL de DMSO à 100°C . Cinquante mg de polysaccharide sont mélangés avec 3 mL d'acide chlorhydrique 2 M, avant d'être incubé 3h à 90°C . Après retour à température ambiante, les échantillons sont neutralisés avec de l'hydroxyde d'ammonium (pH 7-8, 14,5 M) puis un étalon interne (érythritol) est ajouté à hauteur de 1 mg/mL. 400 μL de ce mélange sont alors ajoutés à 2 mL de la solution de DMSO/ NaBH_4 . Le mélange est agité, puis les tubes sont placés pendant 90 min à 40°C dans un bain-marie. 0,6 mL d'acide acétique glacial, 0,4 mL de méthylimidazole, et 4 mL d'anhydride acétique sont ajoutés délicatement à l'échantillon à la sortie du bain-marie. Après un mélange vigoureux, les échantillons sont laissés 15 min au repos puis 10 mL d'eau ultra pure sont ajoutés. Après refroidissement, 3 mL de dichlorométhane sont incorporés au mélange. L'échantillon est mélangé puis laissé à décanter. Un mL de la phase inférieure est récupéré puis évaporé sous jet d'azote. Le culot est repris dans 400 μL de dichlorométhane avant d'être injecté en CPG.

Analyses des monosaccharides dérivés et des acétates d'alditols en CPG/SM

Les échantillons sont analysés sur un chromatographe Agilent 6890 Series GC System équipé d'un passeur automatique Agilent 7683 Series Injector et couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. La colonne utilisée est une colonne non polaire, contenant du diméthylpolysiloxane (Figure 45)

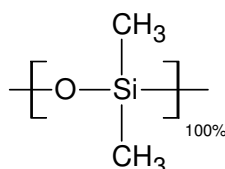


Figure 45 Greffage diméthylpolysiloxane composant la colonne capillaire HP-1 (30 m, 0,320 mm, 0,25 μm) utilisée pour les analyses en CPG/SM.

Matériels et Méthodes

Les échantillons sont analysés dans les conditions suivantes : (i) pression du gaz vecteur (hélium) : 8,8 psi, (ii) débit colonne : 20 mL.min⁻¹, (iii) rapport de split : 75, (iv) quantité injectée : 1 à 5 µL, (v) ionisation : Impact Electronique (EI, 70 eV), (vi) température de la trappe : 150°C (vii) ions ciblés : plage de masse de 40-800 m/z, (viii) programme de montée en température du four (Tableau 7).

Tableau 7 Gradients de température utilisés en CPG.

	Traitement des Echantillons	Montées en température (°C.min ⁻¹)	Paliers de température (°C)	Durée des paliers (min)
Programme 1	Hydrolysats TMS	-	100	3
		8	200	1
		5	280	5
Programme 2	Acétates d'alditols	-	50	1
		20	120	0
		2	240	3
		20	280	5
Programme 3	Acétates d'alditols	-	50	1
		20	120	0
		10	240	3
		20	280	5

Le programme 1 est utilisé pour les hydrolyses avec l'HCl et les méthanolyses. Les programmes 2 et 3 ont été utilisés pour la formation d'acétates d'alditols. Ils sont adaptés des travaux de Garon-Lardièrre (2004). Les analyses par CPG/SM permettent de mesurer des rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations. Un filament de rhénium chaud émet des électrons qui entrent en collision avec les molécules éluées en sortie de la colonne de CPG. Ces impacts électroniques entraînent l'ionisation des molécules. Les ions ainsi formés sont focalisés vers le centre de la trappe par l'intermédiaire de 3 lentilles. La trappe est formée d'une électrode circulaire (ring electrode) recouverte de 2 coupes sphériques (Endcap), et elle est chauffée à 150°C. Les ions sont stabilisés dans la trappe par la superposition de tensions continues et alternatives (radiofréquence RF) sur ces électrodes selon des orbites bien définies, permettant d'obtenir un quadripole. Puis l'amplitude de la RF augmente progressivement, entraînant l'éjection des ions en fonction de leur rapport m/z. Enfin les ions sont détectés par un multiplicateur d'électrons. Les données sont traitées avec le logiciel Enhanced Chemstation Data Analyzer

G1701CA et une base de données construite avec le logiciel MestReNova (7.1.0-9185) permet l'identification des molécules.

2.3.3. Analyse des liaisons glycosidiques par Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

Une des étapes fondamentales à l'analyse et à la compréhension de la structure d'un polysaccharide passe par la détermination des liaisons glycosidiques reliant les monosaccharides entre eux. La position des liaisons glycosidiques constitutives du polysaccharide produit par les microalgues *R. violacea* est déterminée par analyse CPG/SM des monosaccharides après transformation en acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM) (Figure 46).

La méthode la plus connue passe par la méthylation des groupements hydroxyles libres du polysaccharide suivie d'une hydrolyse acide et/ou enzymatique des liaisons glycosidiques (Peña *et al.*, 2012). Les monosaccharides sont ensuite réduits en alditols via l'utilisation de borohydrure de sodium (ou de borodeuteride de sodium pour marquer le groupement engagé dans le pont osidique) puis acétylés au niveau des groupements hydroxyle libres (Figure 46).

Les molécules générées portent le nom d'acétates d'alditols partiellement O-méthylés (Figure 47) et permettent d'accéder, après fragmentation par impact électronique, à des informations structurelles comme la position des groupements O-méthyle et O-acétyle et donc des groupements hydroxyles engagés ou non dans une liaison glycosidique (Carpita et Shea, 1989).

Notons que la présence de groupements annexes, comme des sulfates, peuvent gêner l'analyse des liaisons glycosidiques. Il est donc nécessaire de comparer les spectres CPG/SM de polysaccharides natifs et désulfatés perméthylés (Garon-Lardière, 2004).

Matériels et Méthodes

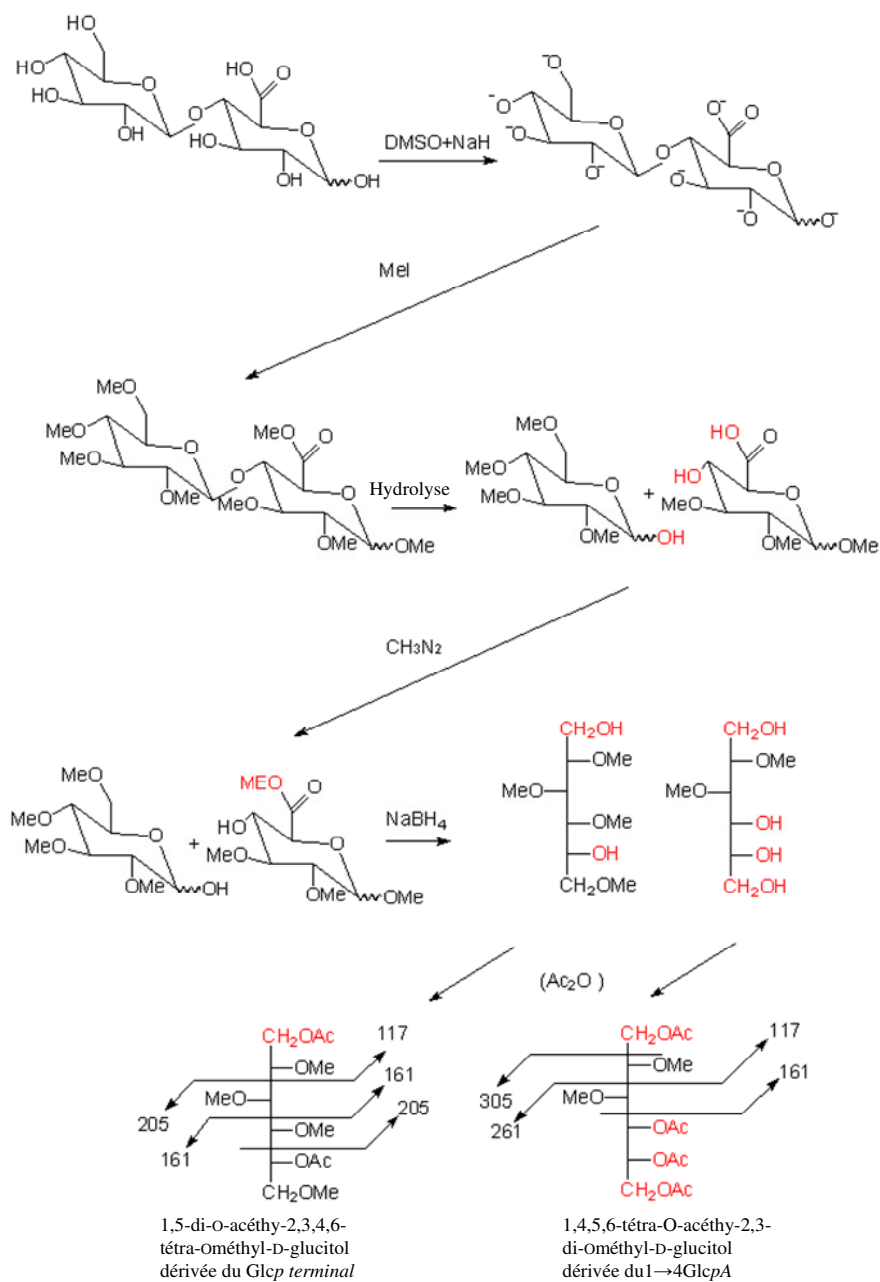


Figure 46 Formation des AAPM, d'après Garon-Lardière (2004).

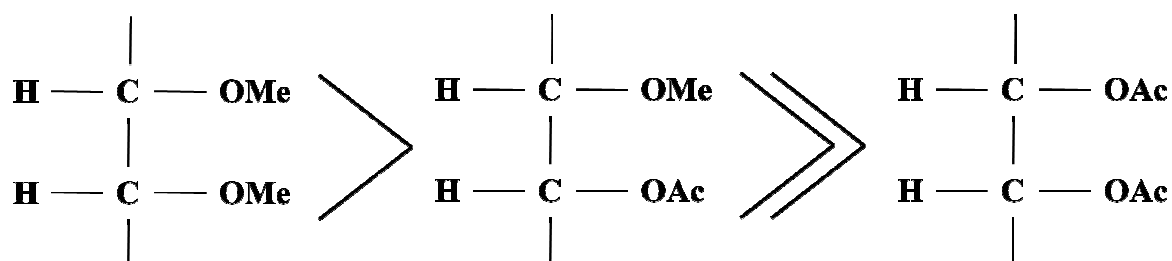


Figure 47 Ordre de clivage préférentiel au sein des AAPM, d'après Garon-Lardière (2004).

2.3.3.1. Préparation du réactif solide NaOH/DMSO

La méthylation de polysaccharides via l'utilisation d'hydroxyde de sodium solide dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) est une méthode de méthylation souvent privilégiée à celles impliquant l'utilisation du BuLi dans du DMSO. La méthode utilisée est adaptée de Ciucanu et Kerek (1984).

Cent μL d'hydroxyde de sodium aqueux 50% (w/v) sont ajoutés à 200 μL de méthanol anhydre dans un tube fermé. Après une agitation forte et l'obtention d'une solution limpide, ajouter 1 mL de DMSO anhydre, vortexer puis centrifuger pendant 5 min à 3600 g. Après centrifugation, il est nécessaire de retirer le surnageant puis d'ajouter à nouveau 1 mL de DMSO, mélanger et centrifuger comme précédemment. Cette étape doit être répétée deux fois supplémentaires, jusqu'à l'obtention d'un culot de NaOH opalescent (laiteux). Pour terminer, resuspendre le culot dans 200 à 300 μL de DMSO anhydre et utiliser directement le réactif pour l'étape de méthylation.

2.3.3.2. Méthylation du polysaccharide

Cent à 200 μg de polysaccharides lyophilisés sont ajoutés à 200 à 500 μL de DMSO anhydre dans un tube hermétique. Agiter doucement, à 60°C si nécessaire pour améliorer la solubilité du polysaccharide. Deux cents μL de NaOH dans du DMSO sont ajoutés à l'échantillon ainsi que 10 μL d'eau ultra pure, qui permettent de limiter les dégradations oxydatives (Ciucanu et Costello, 2003). Le mélange est ensuite conservé, après agitation, pendant 15 min à température ambiante. Trois cents μL d'iodométhane sont ensuite ajoutés et l'échantillon est conservé pendant 15 min à température ambiante puis refroidit dans la glace. Ajouter ensuite 1 mL d'eau ultra pure et vortexer. L'excès d'iodométhane est éliminé sous un jet d'azote puis 1 mL de chloroforme est ajouté. Vortexer puis centrifuger pendant 5 min à 3000 g et transférer la phase inférieure organique dans un nouveau tube. La phase organique est ensuite lavée trois fois avec de l'eau ultra pure puis le chloroforme est évaporé sous jet d'azote. Les résidus méthylés sont finalement repris dans un volume variable de méthanol. Les échantillons peuvent être stockés, en cas de nécessité, à -20°C.

2.3.3.3. Formation des AAPM

A partir des échantillons méthylés, évaporer totalement le méthanol. Un mL d'acide trifluoroacétique (ATF) 2 M est ajouté à 200 à 500 μg de matériel méthylé et 50 μL de *myo*-inositol à 20 mM sont additionnés à l'échantillon. Le matériel méthylé peut être

Matériels et Méthodes

remplacé à cette étape par les monosaccharides standards (L-Rha, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GalA, D-GlcA) : préparer une solution à 20 mM de chaque monosaccharide dans de l'eau ultra pure, puis lyophiliser des masses croissantes (10 à 100 μ L d'aliquot de départ) de la solution.

L'échantillon est ensuite chauffé pendant 90 min à 120°C, puis refroidir le tube jusqu'à atteindre la température ambiante. Evaporer l'ATF sous jet d'azote puis éliminer les traces résiduelles par addition de 1 mL de méthanol ou d'acétone à évaporer (bien mélanger le tube au préalable). Cette étape peut être renouvelée si nécessaire puisque le pH requis pour l'étape suivante doit être alcalin afin d'assurer une bonne réduction des monosaccharides. A cette étape, les échantillons peuvent être congelés à -20°C.

Une solution de borohydrure de sodium ou de borodeuteride de sodium (pour marquer les groupements engagés dans les ponts oxydiques) à 100 mg/mL dans une solution d'hydroxyde d'ammonium à 1 M. Cette solution est ensuite diluée avec 5 volumes de DMSO. Six cent μ L de cette solution diluée sont ajoutés à l'échantillon et la solution est incubée 90 min à 45°C. Il est important de mélanger toutes les 30 min. Ajouter ensuite 100 μ L d'acide acétique glacial pour éliminer le NaBH_4 (ou NaBD_4) en excès et agiter vigoureusement. Cent μ L de 1-methylimidazole et 75 μ L d'anhydride acétique sont ajoutés. Bien mélanger et conserver 30 min à 40-45°C. Pour terminer la réaction, ajouter 2 mL d'eau ultra pure et mélanger fortement. Refroidir le mélange à température ambiante puis ajouter 1 mL de dichlorométhane et agiter pendant 1 min. La solution est ensuite centrifugée pendant 5 min à 3000 g et la phase supérieure est jetée. Répéter l'étape de lavage à l'eau 5 fois supplémentaires afin d'éliminer les traces résiduelles de sels et de DMSO. Pour finir, évaporer la phase organique (inférieure) sous jet d'azote et reprendre les AAPM dans 100 à 200 μ L de dichlorométhane. Injecter les échantillons en CPG/SM dans les conditions décrites précédemment et une montée en températures du four selon le programme 3 (Tableau 7).

2.3.4. Analyse infrarouge

Les analyses infrarouges ont été réalisées avec un spectromètre Nicolet 380 FT-IR (Thermo Electron Corporation) à transformée de Fourier. Le traitement de données est réalisé avec le logiciel Omnic (version 7.3). La gamme de longueurs d'onde utilisée est comprise entre 400 et 4 000 cm^{-1} .

Matériels et Méthodes

Cinq mg de polysaccharide sont mélangés à 100 mg de KBr préalablement séchés dans une étuve à 110°C. Le mélange est homogénéisé dans un mortier puis compacté pour former une pastille analysable.

2.3.5. Propriétés physico-chimiques des polysaccharides

2.3.5.1. Etude rhéologique

La rhéologie est l'étude de l'écoulement ou de la déformation de produits sous l'effet des contraintes qui leur sont appliquées.

La force appliquée par unité de surface d'un fluide définit la contrainte de cisaillement τ (Pa ou N.m⁻²) qui est une grandeur définie en tout point du matériau. Elle est généralement constante au sein d'une même couche et est différente entre les couches (Equation 6).

$$\tau = \frac{F}{S} = \eta \frac{dv}{dz} = \eta \dot{\gamma} \quad (\text{Equation 6})$$

$\dot{\gamma}$: Taux de cisaillement ou vitesse de cisaillement (shear rate) en s⁻¹

η : Viscosité dynamique en Pa.s

F: Force de frottement qui s'exerce à la surface de séparation de deux couches qui s'opposent au glissement d'une couche sur l'autre en N

S (ou H) : Surfaces en contact avec le liquide (m²)

dv : Différence de vitesse entre les deux couches en m.s⁻¹

dz: Distance séparant les deux couches de fluides contiguës en m

La viscosité apparente d'un liquide varie avec le taux de cisaillement auquel il est soumis. La manière dont la viscosité apparente change va permettre de définir le comportement rhéologique du liquide (Figure 48).

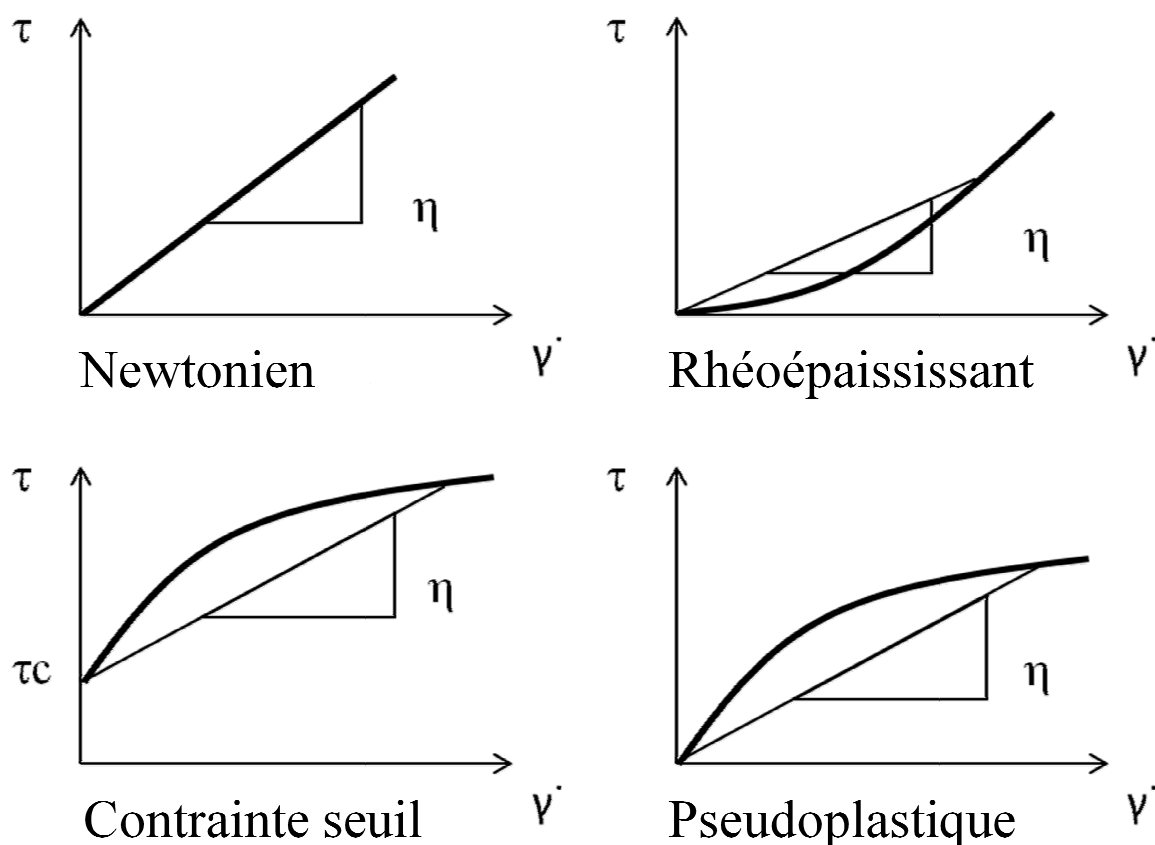


Figure 48 Comportements rhéologiques de liquides aux propriétés physiques différentes.

Les mesures de viscosités apparentes ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre AR 2000 (TA instruments) en système rotatif avec une géométrie plan/plan à une température de 25°C (enceinte thermostatée par un système Peltier). La résistance du produit s'observe au niveau de l'entrefer de la géométrie (distance entre les deux plans). L'entrefer du système (ou gap) est de 5 mm et le volume approximatif de solution nécessaire à la mesure est de 2 mL. A chaque fois que le rhéomètre est mis en fonction ou que la géométrie utilisée change, il faut réaliser un « rotational mapping » c'est à dire une cartographie du système. Le nombre d'itérations choisi est de 2 et le système est en mode « soft » puisque les solutions sont considérées comme moyennement visqueuses. Les contraintes de cisaillement appliquées vont de 10^{-2} à 10^3 s^{-1} .

Dans le cadre de notre étude, la viscosité apparente a été déterminée en débit constant. Autrement dit le fluide est soumis à un flux laminaire de cisaillement. Les courbes de rhéologie obtenues présentent 20 points avec 5 points par décade. Chaque point représente la moyenne de trois mesures consécutives avec un pourcentage de tolérance de 5% (pourcentage

Matériels et Méthodes

de différence entre les mesures). Des mesures sont réalisées toutes les 10 secondes avec un temps maximal de 1 minute par point soit un temps de mesure de 21 minutes maximum.

Pour des solutions pseudoplastiques qui présentent deux plateaux Newtoniens, le modèle de Cross (1965) (Equation 7) est utilisé pour déterminer la viscosité apparente de la solution au plateau Newtonien à faible cisaillement à l'aide du logiciel *Rheology Advantage 3.0*.

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_s - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + \left(K \dot{\gamma} \right)^n} \quad \text{(Equation 7)}$$

K : constante de temps

n : exposant de la loi de puissance

η_s : viscosité apparente de la solution au plateau newtonien à faible cisaillement en Pa.s

η_{∞} : viscosité de la solution au plateau newtonien à fort cisaillement en Pa.s

La viscosité spécifique, nombre sans dimension, est déterminée à partir de la viscosité apparente à faible cisaillement (Equation 8).

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad \text{(Equation 8)}$$

η_0 : la viscosité du solvant $\eta_0 = 0,001$ Pa.s (viscosité de l'eau)

L'étude rhéologique des solutions de polysaccharide permet de déterminer leur concentration critique de recouvrement C^* , c'est-à-dire les concentrations de transition entre les régimes dilué et semi-dilué (Figure 49). Cette information est accessible en traçant $\eta=f(C)$.

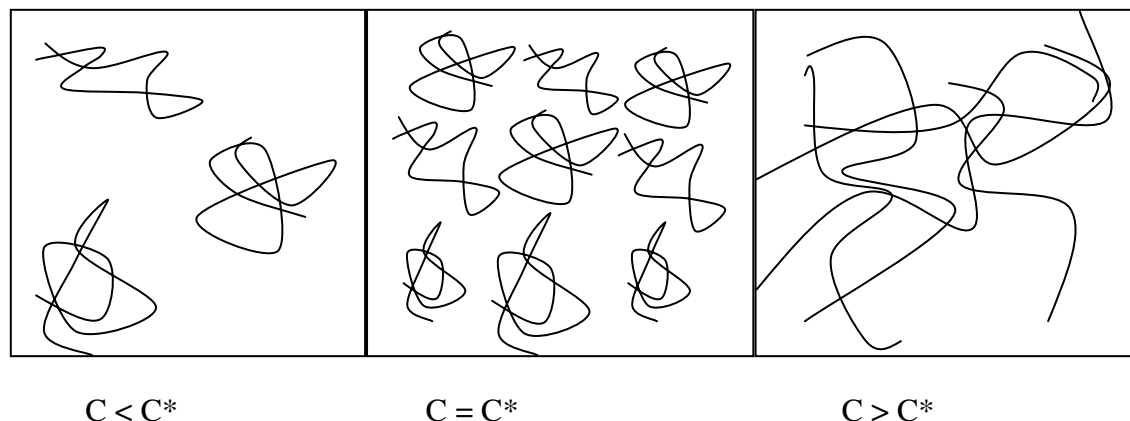


Figure 49 Etat d'enchevêtrement des polymères en fonction de la concentration

C^* = concentration critique de recouvrement et C concentration de la solution. La concentration critique de recouvrement est la concentration qui délimite le régime dilué et le régime semi dilué.

2.3.5.2. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles (CES-DLLMA)

L'étude en régime dilué des propriétés physico-chimiques des polymères et notamment la détermination de leur masse molaire peut être réalisée en chromatographie d'exclusion stérique (ou gel perméation) couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multiangles (CES-DLLMA ou SEC MALLS : Size Exclusion Chromatography – « Multi-Angle Laser Light Scattering ») et d'un réfractomètre différentiel.

La chromatographie permet la séparation des molécules en fonction de leur taille. En sortie de colonne un réfractomètre quantifie la quantité de polymère et un détecteur à diffusion de la lumière à angles multiples détermine la masse molaire des macromolécules.

Les polysaccharides sont mis en solution dans l'éluant de chromatographie : une solution de nitrate de lithium (LiNO_3) à 0,1 M. Le système chromatographique utilisé comprend un injecteur automatique d'échantillons (*SIL 20A*, Shimadzu) exploité via un module de communication (*CBM 20A communication bus module* de Shimadzu). Le solvant est entraîné par une pompe (*LC 10Ai*, Shimadzu) à un débit de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ vers deux filtres disposés en série : $0,45 \mu\text{m}$ et $0,1 \mu\text{m}$. Un dégazeur en ligne (*DGU 20A3 prominence*, Shimadzu) est placé avant la pompe. Le produit est d'abord entraîné dans une pré-colonne (*shodex OH Pak SB.G*) avant d'être dirigé vers deux colonnes d'exclusion stérique disposées en série (*shodex OH Pak SB 804-806*). A la sortie de la colonne, les composés sont quantifiés par un réfractomètre

Matériels et Méthodes

différentiel (*RID 10A*, Shimadzu) (dn/dc utilisé : $0,15 \text{ mL.g}^{-1}$) puis un détecteur à diffusion de lumière multiangle (18 angles) Dawn® heleos (Wyatt technology). Les données obtenues sont traitées avec le logiciel Astra 5.3.4.

Le logiciel Astra donne les variations de l'intensité de la lumière diffusée au niveau de chaque photorécepteur. La relation générale de la diffusion de la lumière est donnée par l'équation de Zimm (1948) (Equation 9).

$$\frac{K_C}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \times \frac{R_g^2}{M_w} \times \sin^2 \frac{\theta}{2} + 2A_2 c + C^2 \quad (\text{Équation 9})$$

$$\text{Où} \quad K = \frac{2\pi^2 n_0}{\lambda_0^4 N_a} \left[\frac{dn}{dc} \right]^2 \quad (\text{Équation 10})$$

ΔR_θ : Rapport de Rayleigh

C : Concentration en polymère (g.mL^{-1})

M_w : Masse molaire moyenne en masse du polymère

R_g : Rayon de giration (nm)

n_0 : Indice de réfraction du solvant

λ_0 : Longueur d'onde du faisceau incident (nm)

N_a : Nombre d'Avogadro

θ : Angle d'observation par rapport à la lumière incidente

A_2 : Second coefficient du viriel

La masse molaire M_w et le rayon de giration s'obtiennent également par le diagramme de Zimm [$Kc/\Delta R_\theta$] = $f(\sin^2(\theta/2))$ avec $1/M_w$ comme ordonnée à l'origine.

L'indice de polydispersité (I_p), les masses molaires moyennes en nombre (M_n) et les masses molaires moyennes en masse (M_w) sont obtenues par chromatographie. L' I_p est un paramètre donnant des informations sur l'homogénéité des solutions. Le M_n est la masse totale des molécules d'un échantillon divisée par la quantité de molécules contenues dans l'échantillon. Le M_w est la masse molaire moyenne en masse. Elle prend en compte la place que les molécules prennent en rapport avec leur taille. C'est-à-dire qu'elle prend en considération le

Matériels et Méthodes

fait que les molécules plus petites occupent moins de masse que les grosses molécules sur la masse totale de l'échantillon (Equation 11).

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_x M_x}{\sum n_x} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum n_x M_x^2}{\sum n_x M_x} \quad Ip = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad (\text{Équation 11})$$

x : Degré de polymérisation

n_x : Nombre de macromolécules de degré de polymérisation x

M_x : Masse molaire des macromolécules

La taille des molécules est importante pour la détection en diffusion de la lumière. En effet, plus les molécules sont grosses plus elles diffusent. Par conséquent, la concentration doit être adaptée afin de ne pas saturer les détecteurs. Les polysaccharides sont donc élués à des concentrations comprises entre 0,1 et 1 g.L⁻¹ en fonction de leur taille.

3. Mesure des activités antiparasitaires des polysaccharides

Les activités biologiques des polysaccharides ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE) de l'Université Blaise Pascal.

Les tests *in vitro* ont été réalisés sur des cultures de cellules humaines fibroblastiques de prépuce (Human Foreskin Fibroblast : HFF) en présence de la microsporidie *Encephalitozoon cuniculi*. Les tests *in vivo* ont été effectués sur des abeilles (*Apis mellifera*) infectées par la microsporidie *Nosema ceranae*.

3.1. Test des activités antiparasitaires

3.1.1. Tests *in vitro* sur le modèle HFF –*Encephalitozoon cuniculi*

Les tests *in vitro* sont des tests ELISA réalisés sur des cultures de cellules HFF en présence d'*E. cuniculi*. Le test ELISA est basé sur la reconnaissance spécifique d'un anticorps des protéines de surfaces parasitaires. Il permet de suivre la croissance des microsporidies. L'anticorps est obtenu après infection de lapins par des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi*. Le sang de lapins infectés est récupéré puis le sérum contenant les anticorps est extrait. L'anticorps est spécifique des microsporidies mais les protéines cibles de l'anticorps ne sont pas connues.

Matériels et Méthodes

La fumagilline est utilisée comme traitement témoin. La fumagilline est un antibiotique naturel sécrété par un champignon *Aspergillus fumigatus* (Figure 31). C'est un antibiotique à usage vétérinaire qui permet de lutter contre les microsporidies. Les polysaccharides ont été testés à quatre concentrations 200, 100, 20 et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Le milieu de culture des cellules HFF et des spores est préparé avec une base Minimum Essential Medium (MEM) (Life technologies). Le MEM est additionné d'antibiotiques (streptomycine 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pénicilline 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et fungizone 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et de glutamine (2 mM - acide aminé instable). Le milieu est finalisé par addition de sérum de veau foetal décomplémenté à raison de 5 à 10% (v/v). Il apporte des facteurs de croissance et de différenciation. Les différents composants du milieu sont stériles et le mélange s'effectue sous une hotte stérile.

Les cellules HFF sont maintenues en boîte de culture, avec renouvellement du milieu 1 à 2 fois par semaine. Lorsque les cellules sont utilisées pour les expérimentations, le milieu est retiré des boîtes de cultures, puis les cellules sont lavées et mises en suspension avec 2 mL de trypsine-EDTA (0,5% trypsine et 0,2% EDTA, % massique) pendant 5 min à 33°C.

Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez, puis elles sont diluées avec du milieu pour obtenir une concentration cellulaire de 10^5 cellules.mL⁻¹. Les HFF sont déposées dans des plaques 96 puits (200 μL /puits) incubées dans une étuve à CO₂ (5%) à 33°C jusqu'à ce qu'elles soient à confluence (48h).

Les microsporidies sont préalablement cultivées dans des boîtes de culture avec des cellules HFF à confluence. Après destruction des cellules HFF, les parasites sont stockés à 4°C. Une suspension de microsporidies est réalisée à 25.10⁵ spores.mL⁻¹ à partir de la solution stock. Les cellules (HFF) dans les puits sont pré-incubées 2h avec les polysaccharides avant infection. Les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* sont pré-incubées 1h avec les polysaccharides, puis mises en contact pendant 1h avec les cellules (le polysaccharide est toujours présent à des concentrations comprises entre 50 et 200 mg.L⁻¹, pour un volume de 200 μL). Après un lavage avec un tampon phosphate de type PBS (Phosphate Buffered Saline 1X, pH 7,4 : 137,5mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,8mM de KH₂PO₄ et 10 mM de Na₂HPO₄), afin d'éliminer les spores non adhérentes, les polysaccharides sont ajoutés à la concentration souhaitée et les cultures sont incubées pendant 5 jours.

Matériels et Méthodes

Après 5 jours d'incubation, les cellules sont lavées puis fixées avec du méthanol pendant 20 min à -80°C. Les puits sont ensuite lavés avec du PBS, puis saturés avec une solution de SAB à 5% (m/v) (2h sous agitation, à 37°C). L'anticorps primaire est un anticorps de lapin qui va se fixer sur la membrane des microsporidies. L'anticorps secondaire anti-Ig de lapin est couplé à la phosphatase alcaline, dont le substrat est le 4-méthyl-umbelliferyl phosphate (MUP, Figure 50).

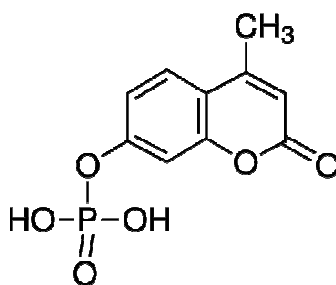


Figure 50 Structure du MUP.

La fluorescence est lue au fluoroscan avec une longueur d'onde d'excitation de 355 nm et une longueur d'onde d'émission à 460 nm. Les densités optiques obtenues sont ensuite utilisées pour comparer la croissance des microsporidies en fonction de l'échantillon. La DO du témoin sans traitement est le référent 100% de croissance des parasites.

3.1.2. Test *in vivo* en cagettes sur le modèle abeille –*Nosema ceranae*

L'expérience se déroule sur 21 jours. Les abeilles sont collectées dès leur naissance. Elles sont prétraitées avec les molécules à tester puis infectées par *N. ceranae* à 5 jours.

3.1.2.1. Préparation des abeilles

Les abeilles sortant de leur alvéole sont prélevées et déposées dans des cagettes (Figure 51 et Figure 52). Chaque cagette contient 45 abeilles.



Figure 51 Abeilles naissantes [6]

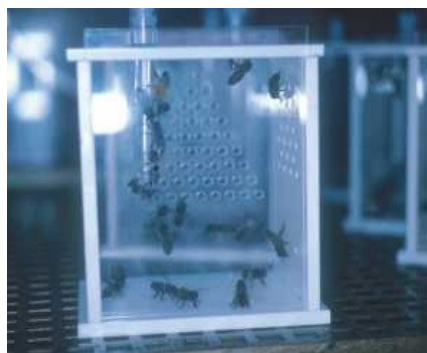


Figure 52 Cagette contenant les abeilles [7]

Matériels et Méthodes

Les insectes sont nourris avec une solution de saccharose à 50% (m/v) contenant le polysaccharide à des concentrations comprises entre 50 et 2000 mg.L⁻¹. 5 mL de sirop sont déposés dans les cagettes, dans un tube à hémolyse. Les tubes de sirop sont pesés et changés tous les deux jours. L'apport de protéines est nécessaire pour la croissance et la survie des abeilles les premiers jours de leur vie. Les protéines sont apportées les 5 premiers jours par du pollen, déposé dans une mangeoire à l'intérieur des cagettes. Des phéromones sont également utilisées pour mimer la présence de la reine dans la cagette. Ainsi, du « Bee Boost », qui est une copie synthétique de la phéromone mandibulaire royale QMP (Queen Mandibular Pheromone), produite et sécrétée par la reine d'*Apis mellifera* est utilisé. Cette phéromone « calme » les abeilles et la mortalité est réduite de manière significative.

3.1.2.2. Infection individuelle

Trois cagettes de 45 abeilles sont utilisées par condition à tester. Pour chaque expérience trois témoins sont réalisés : des abeilles saines non infectées, des abeilles infectées non traitées et enfin des abeilles traitées à la fumagilline (40 µg.mL⁻¹).

Les cagettes, contenant les abeilles âgées de cinq jours, sont placées sous CO₂ et les abeilles endormies sont infectées à l'aide d'une pince et d'une pipette automatique, à raison de 5 µL de solution de spores par abeille (1,25 10⁵ spores/abeilles).

3.1.2.3. Suivi des abeilles et de l'infection

La quantité de saccharose consommé et la mortalité des abeilles sont suivies.

Au bout de 21 jours les abeilles sont sacrifiées (étêttement), pour compter le nombre de spores qu'elles contiennent. La spore prolifère au niveau des cellules de l'intestin des abeilles. Par conséquent l'ampoule rectale et l'intestin des abeilles sont prélevés, puis déposés dans des microtubes. Le contenu des microtubes est broyé et dilué, puis le nombre de spores est déterminé par comptage en cellule de KOVA.

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Identification de la microalgue *R. violacea* LMGEIP 001

La souche de microalgue rouge utilisée dans ce travail de thèse ayant fait l'objet d'une identification uniquement sur des critères morphologiques, son identification par des techniques de biologie moléculaire (séquençage du gène codant pour l'ARN 18S) a été réalisée au début de ce travail de thèse.

L'ADN a été extrait d'une culture de *R. violacea* en phase de croissance. Il a été amplifié par PCR à l'aide des primers Euk-1F et Euk-1520R. Après amplification et électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un standard de masse molaire (Hyperladder I) un fragment d'environ 1 000-pb a été identifié (Figure 53). Après séquençage, la séquence élucidée comportait 976-pb (Figure 54).

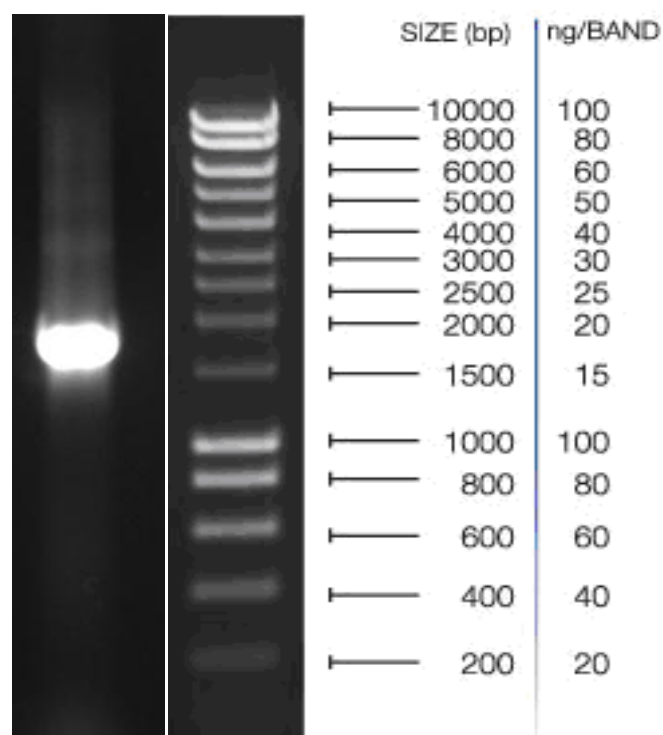


Figure 53 Migration du fragment d'ADN codant pour l'ARNr 18S de *Rhodella violacea* avec une échelle de poids moléculaire (Hyperladder I).

Résultats et discussion

```
CTAGTATAACGCTTTTATACTGTGAACTGCGAATGGCTCATTAAACAGTTATAGTTTATTTGATAGTACTGATTACTCGGATAACCCAA
GTAATTCCTTGAGCTAATACGTGCCTCAACGCCCAACTCACGAAGGGTGGTATTTATTAGTTTTAAACCAATCGGCTTGCCGTTTTTGGTG
AATCATAGTAACTTTTCGGATCGCATGGCTTCGGCCGGCGACAAATCATTCAAATATCTGCCCTATCAACTTTGGATGGTAAGGTAGTGGC
TTACCATGGTGGTAACGGGTAACGGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCATGGAAGGCA
GCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACTCAGGGAGGTAGTGACAAAAATAACGGTAGAGCGCCCTCGTGGTGTCTCTAATTGGAAT
GAGTACAATTTAAAATTGTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATT
AAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTCGGATTTCCGGGTGCTGCCCGGTGTAGCCACGGCGAACGCCGGGTGGGGCCTTCCTTCTG
GGATTCTCTGCACTCTTTACTGAGTCGGATGGCGTTCCAGGACGTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGCGATTGCCGT
GAATACATTAGCATGGGATAATAGAATAGGACTTTGGAATATTTTGTGGTTTGGGTACGAAGTAATGATTAATAGGGACGGTTGGGG
GCATTCCGATTCCGTTGTGAGAGGTGAAATCTTAGATTAGCGGAAGACGAACAGCTGCGAAAGCGTCTGCCAAGGACGTTTTCATTG
ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAACTATGCCGACTAGGGATCAGCG
```

Figure 54 Séquence d'ADN codant pour l'ARNr 18S de *R. violacea*.

Les bases de données (NCBI), où les séquences partielles codant pour l'ARNr 18S de microalgues du genre *Rhodella* sont déposées, montrent une longueur de séquences de 1700-pb (*Rhodella maculata* GU191839 avec 1784-pb, *R. violacea* AB045604 avec 1719-pb). La séquence d'ADN obtenue a été déposée dans la base de données GenBank sous le numéro d'accès KC515354. Les séquences partielles d'ADN codant pour l'ARNr 18S d'autres microorganismes photosynthétiques (*Cyanidium caldarium*, *Porphyridium aeruginum*, *Porphyridium purpureum*, *Porphyridium sordidum*, *Rhodella* sp., *R. violacea* et *R. maculata*) ont été récupérées en utilisant tblastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin de déterminer les homologies avec la séquence isolée. Les séquences ont été ensuite alignées en utilisant ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). La séquence d'ADN KC515354 a montré des homologies avec les séquences d'ADN codant pour l'ARNr 18S des microalgues utilisées. Ainsi, 717 nucléotides de la séquence partielle du gène de l'ARNr 18S de la microalgue LMGEIP 001 présentent 100% d'homologie avec les séquences appartenant aux sept souches testées. Une analyse phylogénétique (Figure 55) des séquences des gènes d'ARNr 18S testées, en utilisant le logiciel MEGA, a révélé que la souche LMGEIP 001 fait partie du genre *Rhodella*, et plus précisément de l'espèce *Rhodella violacea*. Cette identification est confirmée par la valeur de bootstrap (100 pour le groupe *Rhodella* et 62 pour l'espèce *R. violacea*). A noter que les microalgues *Rhodella* sp., *R. violacea* et *R. maculata* correspondent à la même espèce (*R. violacea*) suite à la nouvelle nomenclature où *R. violacea* est la seule espèce de microalgues du genre *Rhodella* (Scott *et al.*, 2011).

Résultats et discussion

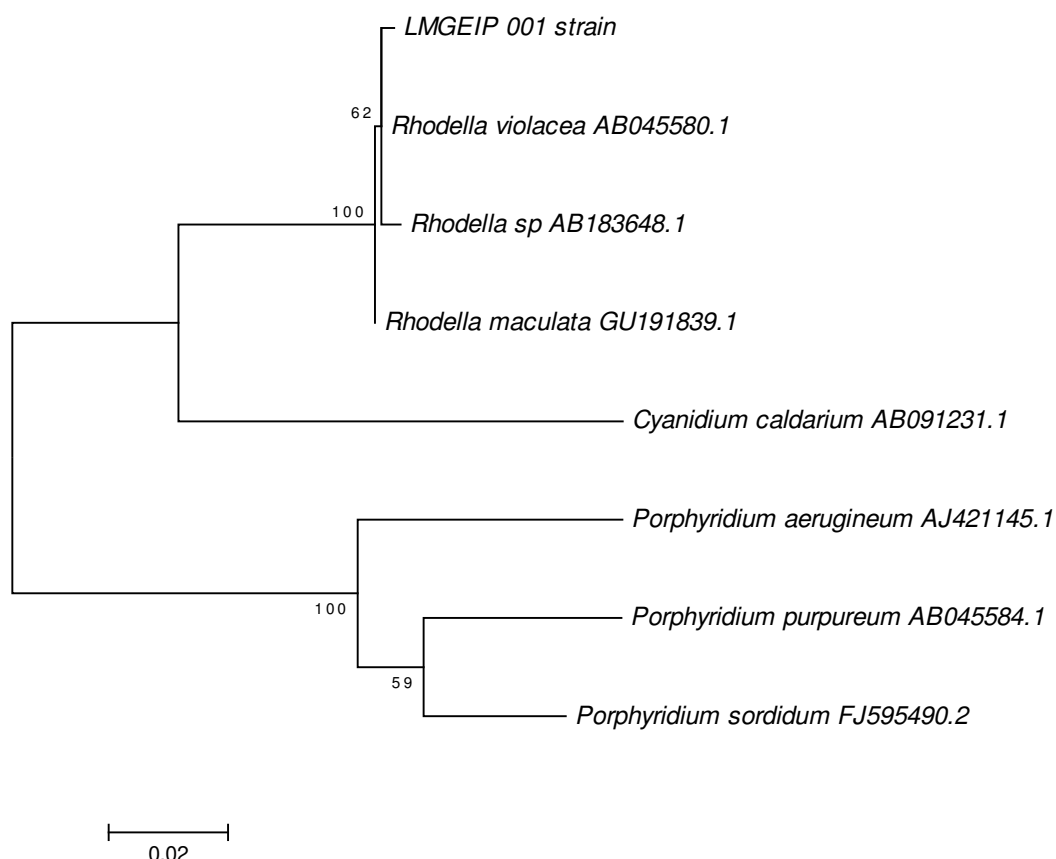


Figure 55 Arbre phylogénétique déduit de la comparaison des séquences des gènes codant pour les ARNr 18S de microalgues rouges: *Cyanidium caldarium*, et d'espèces appartenant aux genres *Rhodella* et *Porphyridium*. Les numéros d'accès des souches sont indiqués.

La comparaison des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 18S de microalgues avec celle obtenue pour la microalgue utilisée dans ce travail de thèse a donc permis son identification comme étant une microalgue appartenant à l'espèce *Rhodella violacea*.

2. Mode de culture des microalgues

Une des premières étapes conduisant à la caractérisation des fractions polysaccharidiques produites par la microalgue modèle étudiée dans ce travail, a été la détermination des conditions optimales de culture en termes d'environnement physico-chimique et de milieu de culture. Les microalgues sont des organismes autotrophes et/ou hétérotrophes. Afin de déterminer les meilleures conditions de culture de *R. violacea* LMGEIP 001 pour la production d'EPS, la microalgue a été cultivée dans différentes conditions (autotrophie, hétérotrophie et mixotrophie) en utilisant différents milieux de cultures publiés pour la culture des microalgues rouges (genres *Rhodella*, *Porphyridium*, *Dixoniella*). Pour chaque culture réalisée en fiole d'Erlenmeyer (500 mL), la quantité de cellules est suivie par dénombrement

Résultats et discussion

en cellule de Malassez, et la production d'EPS est quantifiée dans les surnageants de culture par dosage colorimétrique en utilisant le dosage des sucres totaux (Dubois *et al.*, 1956), et en tenant compte de l'interférence des milieux de culture avec ces deux dosages (moindre pour le milieu f/2).

2.1. Cultures en autotrophie

Des cultures de *Rhodella violacea* LMGEIP 001 ont été réalisées en fioles Erlenmeyer avec différents milieux de cultures en autotrophie. Les milieux testés étaient les milieux Provasoli modifié, f/2, Hemerick, Hemerick modifié et EMA. Chaque milieu est utilisé pour la culture de *R. violacea* sous deux conditions : les conditions standards (composition classique, autotrophie et CO₂ atmosphérique comme source de carbone) et les conditions supplémentées (composition classique, autotrophie, bicarbonate de sodium (NaHCO₃) comme source de carbone à la concentration finale de 20 mM). Les cinétiques de croissance ont montré des résultats hétérogènes en fonction des différentes conditions et milieux de culture (Figure 56).

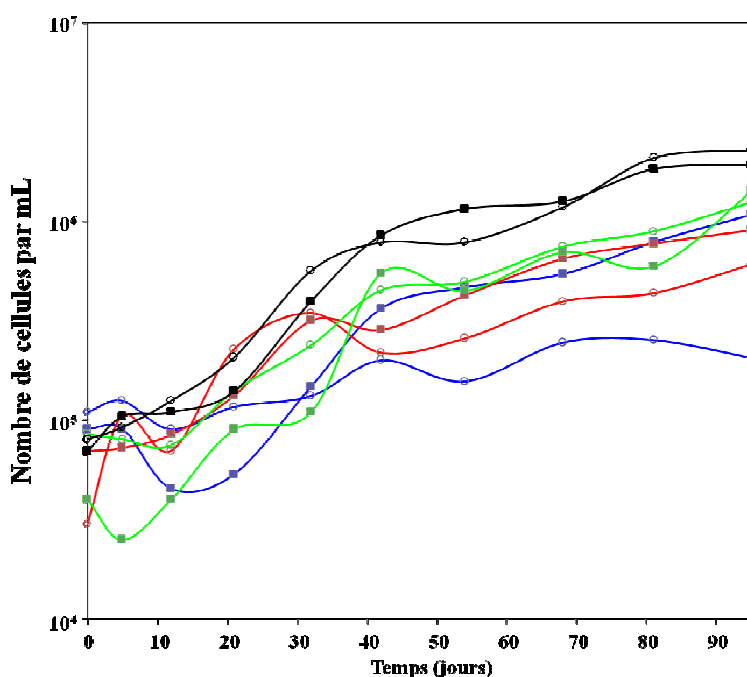


Figure 56 Croissance cellulaire de *Rhodella violacea* LMGEIP 001 en Erlenmeyer, avec différents milieux de culture et ajout de bicarbonate (20 mM).

-○-Milieu Hemerick, -■- Milieu Hemerick + bicarbonate, -○-Milieu Hemerick modifié, -■- Milieu Hemerick modifié + bicarbonate, -○- Milieu EMA, -■-Milieu EMA + bicarbonate, -○- Milieu f/2, -■- Milieu f/2 + bicarbonate.

Résultats et discussion

Aucune microalgue ne s'est développée dans le milieu Provasoli modifié. Les microalgues *Rhodella violacea* LMGEIP 001 se sont développées dans les milieux EMA, Hemerick, Hemerick modifié et f/2.

Le milieu Hemerick modifié sans bicarbonate est le moins performant pour la production de la biomasse par les souches de *R. violacea*, par rapport au milieu standard ou au milieu Hemerick modifié supplémenté en bicarbonate. Le milieu Hemerick modifié ne contient pas de KCl et la quantité de MgSO_4 est divisée par deux ce qui peut expliquer ce phénomène, du fait de carences ou de variations de pression osmotique du milieu. L'apport de bicarbonate contrebalance l'effet de la diminution des sels dans le milieu Hemerick modifié. Ce phénomène peut s'expliquer par la formation de sel de sodium. Le bicarbonate permet une augmentation de la croissance cellulaire des microalgues dans les milieux Hemerick et Hemerick modifié. Ce phénomène a déjà été décrit pour d'autres microalgues telles que *Pavlova lutheri* (Guihéneuf *et al.*, 2009) où l'ajout de bicarbonate (5 mM) dans un milieu de culture à base d'eau de mer artificielle permet d'augmenter la production de biomasse de 15% (m/m).

L'ajout de bicarbonate dans les milieux f/2 et EMA n'a pas d'effet sur la croissance cellulaire. Ce phénomène peut s'expliquer par la composition de ces milieux qui contiennent déjà du bicarbonate en concentrations saturantes dans leur composition initiale (1,3 et 0,5 mM). En effet, il existe une concentration seuil où le bicarbonate n'a plus d'effet sur la croissance cellulaire des microalgues. Cette concentration est atteinte rapidement lors de cultures en fiole Erlenmeyer. A contrario, des cultures en photobioréacteur nécessitent des concentrations en bicarbonate plus importantes pour atteindre la valeur saturante, puisque le taux de croissance est plus élevé. Par exemple, la culture de *Chlorella vulgaris* en présence de concentrations en bicarbonate de sodium de 12 et 18 mM à pH 8,5 permet une production de biomasse maximale (Lam et Lee, 2013).

Les concentrations cellulaires en fin de cultures sont reportées dans le Tableau 8.

Résultats et discussion

Tableau 8 Croissance cellulaire, en fin de cultures et productivité en sucres extracellulaires pour les différents milieux testés.

Milieu de culture	Croissance cellulaire en fin de cultures (cellules.mL ⁻¹)	Concentration finale en sucres extracellulaires (g.L ⁻¹)	Productivité en sucres extracellulaires (g.L ⁻¹ pour 10 ⁶ cellules)
f/2	2,28 10⁶	0,068	0,030
f/2 + bicarbonate	1,93 10 ⁶	0,150	0,078
EMA	1,25 10 ⁶	0,037	0,030
EMA + bicarbonate	1,43 10 ⁶	0,038	0,027
Hemerick	0,61 10 ⁶	0,043	0,070
Hemerick + bicarbonate	0,91 10 ⁶	0,037	0,041
Hemerick modifié	0,21 10 ⁶	0,027	0,130
Hemerick modifié + bicarbonate	1,08 10 ⁶	0,027	0,025

Au vu des résultats, le milieu le plus performant pour la croissance des microalgues *Rhodella violacea* est le milieu f/2 puisqu'il permet d'atteindre la concentration cellulaire la plus importante en fin de culture (2,28 10⁶ cellules.mL⁻¹).

Les productions d'exopolysaccharides en fin de culture (t=95 jours) pour les différentes conditions testées, ont été ramenées à une concentration cellulaire de 10⁶ cellules.mL⁻¹ afin de pouvoir les comparer. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8. La production de polysaccharides par cellule est la plus importante dans le milieu Hemerick modifié, néanmoins la croissance cellulaire est beaucoup trop faible pour permettre une production importante d'EPS. La production d'EPS totale en fin de culture est la plus importante pour le milieu f/2 additionné de bicarbonate, avec une production finale de 0,15 g.L⁻¹. Le milieu f/2 apparaît donc comme le meilleur compromis pour la production de biomasse et d'EPS par les microalgues de l'espèce *R. violacea*.

2.2. Cultures en mixotrophie et hétérotrophie

Les organismes mixotrophes ont la capacité de se développer en utilisant différentes sources de carbone : le carbone organique (glucose) et le carbone inorganique (CO₂). Les cultures en mixotrophie sont conduites avec le glucose comme source de carbone organique et en présence de lumière pour permettre aux microalgues de réaliser la photosynthèse en utilisant le CO₂. Les cultures en hétérotrophie sont par contre conduites avec du glucose comme source de carbone et à l'obscurité.

Résultats et discussion

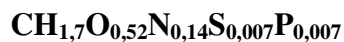
La culture de la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001 a été expérimentée en mixotrophie et en hétérotrophie dans les milieux f/2, Hemerick, et EMA, additionnés de glucose à 20 g.L⁻¹. Comme c'est souvent le cas avec les cultures de microalgues (Croft *et al.*, 2005 ; Scott *et al.*, 2011 ; He *et al.*, 2013) ce mode de culture s'est révélé impossible du fait du manque d'axénicité de la culture. En effet, la présence de bactéries s'est révélée rédhibitoire dans ces conditions car elles se développent très rapidement au détriment des microalgues du fait de la présence de substrat carboné organique (glucose).

Pour conclure, le milieu f/2 utilisé en autotrophie permet les meilleurs rendements de production en exopolymères et les meilleures croissances de biomasse avec la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001. Il a par conséquent été sélectionné pour la suite du travail.

3. Optimisation de la production de biomasse par *Rhodella violacea*

3.1. Analyse stœchiométrique du milieu de culture

Pour pouvoir se multiplier, les microalgues utilisent les ressources de leur environnement. Les cellules contiennent différents éléments dont les plus importants sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le phosphore et le soufre. Il est donc possible d'assimiler une biomasse microalgale à une formule molaire de ces composés élémentaires. Cette formule molaire est rapportée à une mole de carbone et est nommée la formule C-molaire moyenne. La formule C-molaire moyenne d'une biomasse de microorganismes photosynthétiques varie peu d'un microorganisme à l'autre et même d'un microorganisme photosynthétique à un autre microorganisme non photosynthétique. A titre d'exemple, les biomasses de *Arthrospira platensis* (CH_{1,59}O_{0,55}N_{0,14}S_{0,008}P_{0,005}) et *Chlamydomonas reinhardtii* (CH_{1,78}O_{0,50}N_{0,14}S_{0,006}P_{0,018}) sont disponibles dans la littérature (Roels 1983; Pruvost et Cornet, 2012). Elles permettent d'établir une composition C-molaire moyenne applicable à la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001 :



La masse C-molaire associée M_x qui correspond à la masse molaire de la biomasse rapportée à une mole de carbone (Masse molaire de CH_{1,7}O_{0,52}N_{0,14}S_{0,007}P_{0,007}) est de :

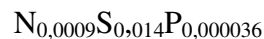
$$M_x = 12 + 1,7 + (0,52 \times 16) + (0,14 \times 14) + (0,007 \times 32) + 0,007 \times 31 = 24 \text{ g/C-mol}_x.$$

Pour une croissance optimale des microalgues, les éléments constitutifs de la biomasse doivent être présents dans le milieu de culture en quantité suffisante. Le carbone étant issu des gaz d'alimentation de la culture (CO₂), l'hydrogène et l'oxygène étant apportés par l'eau du

Résultats et discussion

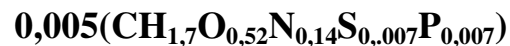
milieu de culture, ils ne sont donc pas limitants pour la production de biomasse. Les autres atomes (S, P et N) doivent être présents dans le milieu en quantités suffisantes pour permettre la production de biomasse (Becker, 1994 ; Pruvost et Cornet, 2012).

La composition en mole d'azote, de soufre et de phosphore a été déterminée pour le milieu f/2. Il contient ces atomes sous la forme suivante : 0,075 g.L⁻¹ de NaNO₃ ; 0,00565 g.L⁻¹ de NaHPO₄.2H₂O ; 0,022 mg.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O ; 0,01 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O ; et 3,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. L'analyse stœchiométrique de la composition d'un litre de milieu f/2, a donc permis de déterminer qu'il contenait :



Le phosphore est l'atome présent en quantité la plus limitante dans le milieu f/2. En effet, les quantités d'azote et de phosphore présentes dans le milieu de culture f/2 sont respectivement 15 fois et 19 fois inférieures à la quantité nécessaire pour une production correspondant à 1 C-mole de biomasse (soit 24 g). Le soufre est par opposition non limitant car en quantité deux fois supérieures.

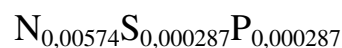
A partir de ces éléments, il est possible d'obtenir la production de 1/19 (0,005) de la formule C-molaire, soit :



Cela correspond à une production maximale de :

$$M = 0,005 \times 24 = 0,12 \text{ g.L}^{-1} \text{ de biomasse}$$

Il apparait donc que ce milieu, tel qu'il est utilisé dans la littérature, est limitant pour la production de biomasse par sa teneur en azote et en phosphore. Pour améliorer cette productivité, le milieu a été modifié avec un objectif de production de biomasse de 1 g.L⁻¹. Produire 1 g.L⁻¹ de biomasse équivaut à produire 0,041 mole soit une composition adaptée à 0,041(CH_{1,7}O_{0,52}N_{0,14}S_{0,007}P_{0,007}), ce qui correspond à une quantité molaire de :



Par conséquent, le milieu f/2 a été supplémenté en ajoutant 0,523 g de NaNO₃ et 0,0288 g de NaH₂PO₄.2H₂O par litre. Ce milieu optimisé a été nommé f/2 modifié et a été testé pour la production de biomasse en photobioréacteur.

3.2. Optimisation de l'activité photosynthétique

Les cultures de microalgues doivent être réalisées dans un milieu de culture optimal comme explicité ci-dessus, mais également dans un environnement physico-chimique (pH, température, irradiance) adapté à la physiologie de la microalgue. Pour définir ces paramètres optimaux, l'activité photosynthétique des microalgues a été analysée en utilisant un oxygraphe, constitué d'une électrode de Clark, qui permet la mesure du dioxygène produit par les microorganismes.

3.2.1. Effet de l'irradiance

L'irradiance est la quantité d'énergie lumineuse par unité de surface. La microalgue *Rhodella violacea* LMGEIP 001 a été exposée dans la chambre de l'électrode de Clark à différentes irradiances (0 à 1600 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). L'évolution de la quantité de dioxygène est mesurée, puis la courbe de la production d'oxygène en fonction de l'irradiance est tracée en utilisant le modèle d'Eilers et Peeters (1988) (Figure 57, d'après l'Equation 3 présentée en Matériels et Méthodes : $rO_2 = rO_2\max \frac{G}{K_1+G+(\frac{G^2}{K_2})} - r_{resp}$).

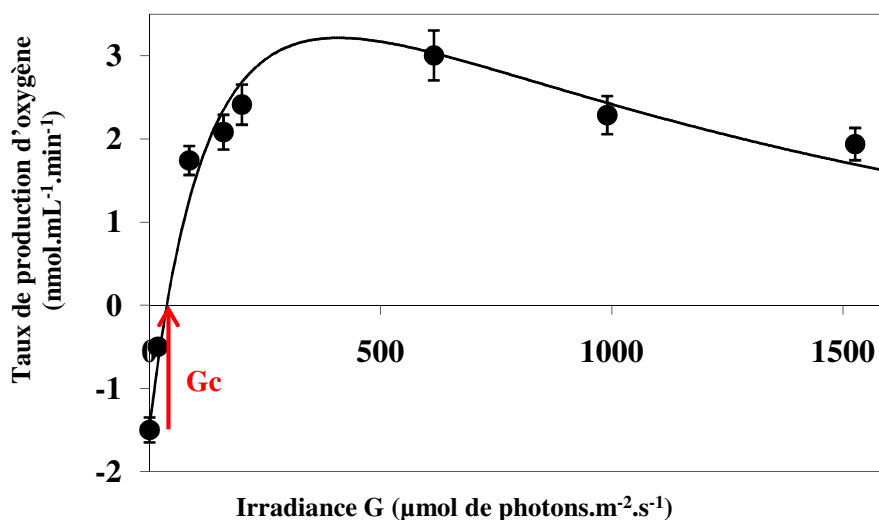


Figure 57 Effet de l'irradiance sur la photosynthèse de *Rhodella violacea*.

-●- Points expérimentaux,- modélisation selon le modèle de Eilers et Peeters (1988), → valeur de l'irradiance au point de compensation $G_c=38 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Mesures obtenues avec une température de 24°C et un pH de 8.

Résultats et discussion

L'équilibre entre la photosynthèse et la respiration est atteint lorsque la respiration consomme la totalité de l'oxygène produit par la photosynthèse. Cela correspond au point de compensation où la production de dioxygène est égale à zéro. L'irradiance au point de compensation (G_c) est de $38 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les constantes K_1 et K_2 ont été déterminées à respectivement 426 et 431.

Le taux de production d'oxygène est maximal pour $420 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cette valeur correspond à l'irradiance de saturation (G_s) qui correspond à $rO_{2\text{max}} = 3,02 \text{ nmol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Au-delà de G_s , l'activité photosynthétique diminue. L'irradiance devient donc inhibitrice et entraîne une photoinhibition responsable de la baisse de l'activité photosynthétique. La valeur de G_s obtenue est en concordance avec celle obtenue par Ritz *et al.*, (2000) qui ont trouvé une irradiance G_s d'une valeur de $500 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour une culture de *Rhodella violacea*. Cependant cette valeur de G_s de $420 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ est supérieure à l'irradiance déterminée par Yokoyama *et al.*, (2004) pour *Rhodella sp.* ou encore à celle déterminée pour *Porphyridium* et *Glaucosphaera sp.* par Millard et Evans (1982) qui cultivent ces microalgues à des irradiances respectives de 20 et $27 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Les microalgues vertes (*Chlorella zofingiensis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorococcum sp.*...), mieux adaptées aux irradiances importantes, du fait de la niche écologique qu'elles occupent (couche d'eau supérieure) sont cultivées à des valeurs d'irradiance comprises entre 150 et $300 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Rise *et al.*, 1994 ; Kozłowska-Szerenos *et al.*, 2004 ; Wua *et al.*, 2012). Contrairement aux données de la littérature précédemment citées, on constate que la souche *R. violacea* LMGEIP 001 est à même de se développer dans cette gamme d'irradiance en approchant son irradiance de saturation. Au regard des données de la littérature, les microalgues rouges sont donc capables de se développer à de faibles irradiances. Cependant leur optimal de croissance est obtenu pour des irradiances plus importantes que celles utilisées en général dans la littérature.

3.2.2. Effet de la température

Afin de déterminer la température optimale de culture de la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001, les cultures ont été soumises à des températures comprises entre 10°C et 30°C sous une irradiance de $420 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La courbe de production d'oxygène en fonction de la température est tracée en utilisant l'équation de Roels (1983) (Equation 4, Figure 58). Les constantes A et B ont été calculées et leurs valeurs sont de $1,47 \cdot 10^{14}$ et $3,42 \cdot 10^{36}$ respectivement.

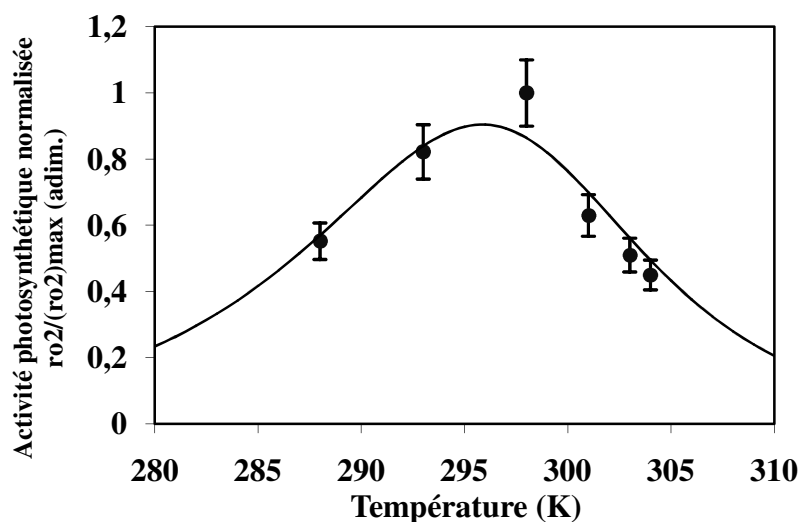


Figure 58 Effet de la température sur la photosynthèse de *Rhodella violacea*

-●- Points expérimentaux, - modélisation selon l'équation de Roels (1983) (Equation 4). Les barres d'erreur correspondent à 5% de la valeur mesurée, tolérance maximale acceptée pour la modélisation.

La température optimale pour la photosynthèse et donc la croissance de *R. violacea* est de 297 K soit 24°C. Cette température correspond aux températures utilisées traditionnellement pour la culture des microalgues rouges dont celles appartenant au genre *Rhodella*. En effet, les microalgues rouges sont généralement cultivées à des température comprises entre 20°C et 27°C (Ritz *et al.*, 2000; Yokoyama *et al.*, 2004; Millard et Evans *et al.*, 1982; Toncheva et Ivanova, 2002). Cependant peu d'auteurs ont réellement testé l'effet de la température sur la croissance cellulaire. Rahaoui (1999) a testé trois températures de culture sur une souche de *Rhodella violacea* : 10°C, 20°C et 30°C sous une irradiance de 150 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. L'auteur a mis en évidence qu'une température de 20°C permet une croissance cellulaire 2 fois supérieure par comparaison avec les deux autres températures (10°C et 30°C), avec une concentration de cellules en fin de culture de $4,23.10^6$ cellules. mL^{-1} .

3.2.3. Effet du pH

L'effet du pH sur l'activité photosynthétique de la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001 a été testé pour des valeurs comprises entre 7 et 9,3. L'irradiance est fixée à 420 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et la température à 24°C (Figure 59). Le pH optimal de photosynthèse a été déterminé à 8,3, bien que peu de variations de la production de dioxygène n'aient été observés entre 7 et 8,3. Au-delà de pH 9 et en dessous de pH 7 (non visible sur la

Résultats et discussion

courbe), la photosynthèse est très faible. Ce résultat est en accord avec la littérature, bien qu'il soit légèrement supérieur au pH 8 décrit pour le milieu f/2 (Guillard et Ryther 1962) où pour la croissance optimale de microalgues rouges du genre *Porphyridium* (pH 8).

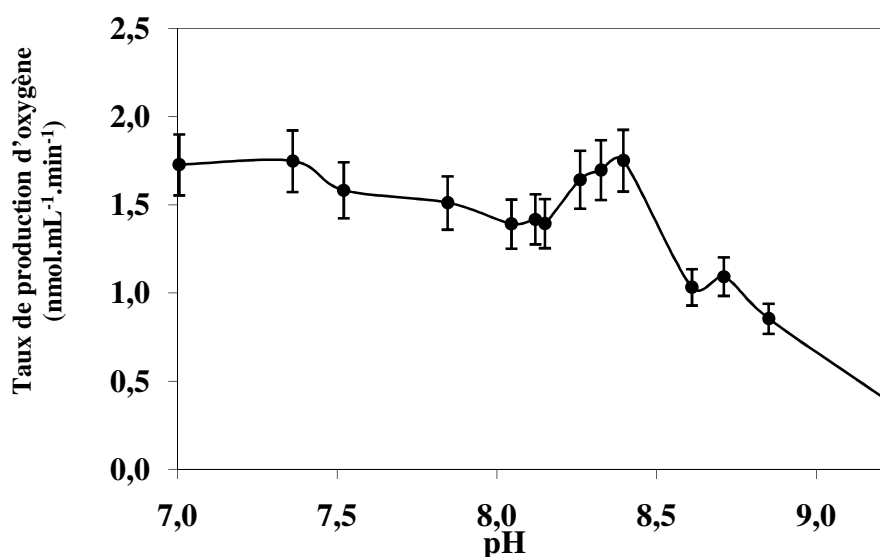


Figure 59 Effet du pH sur la photosynthèse de *Rhodella violacea*.

Mesures obtenues avec une température de 24°C et un pH de 8. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type calculé sur la moyenne de 3 répétitions.

Après analyse des différents milieux de culture, le milieu f/2 a été sélectionné pour la culture de la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001. L'analyse stœchiométrique du milieu f/2 a permis d'optimiser celui-ci afin de pouvoir produire une biomasse de 1 g.L⁻¹. Les paramètres physico-chimiques de l'environnement de culture ont été définis grâce à l'étude de l'activité photosynthétique de la microalgue. Ainsi, une température de 24°C, un pH de 8,3 et une irradiance de 420 $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sont les conditions optimales de culture de *Rhodella violacea*. Afin de valider ces résultats la microalgue a été cultivée sous trois conditions avec un environnement contrôlé de type photobioréacteurs de 600 mL.

3.3. Culture en photobioréacteurs

Au cours de la culture en fiole Erlenmeyer, les microalgues n'ont pas été exposées à un environnement rigoureusement contrôlé en termes d'irradiance, de composition de milieu, d'aération et d'agitation. Par conséquent, afin d'optimiser la production de biomasse les microalgues ont été cultivées dans un environnement contrôlé (photobioréacteur) pour

Résultats et discussion

l'apport en CO₂, la lumière, la température et l'agitation ; le tout dans un milieu de culture de composition adaptée.

3.3.1. Cultures en photobioréacteur de 600 mL

Trois photobioréacteurs de 600 mL identiques et conçus au laboratoire ont été utilisés pour comparer des conditions de cultures différentes de la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001 (Figure 60). Les paramètres variables sont l'irradiance et la composition du milieu de culture. Les 3 cultures en photobioréacteur ont été réalisées à des températures de 24°C, avec un pH de 8,3 et un débit d'air de 133 mL.min⁻¹ (teneur en CO₂ de 1%).



Figure 60 Photobioréacteurs de 600 mL

Le photobioréacteur A (PA) reproduit les conditions classiques de culture dans le milieu f/2 sous une irradiance de 150 μmol de photons.m⁻².s⁻¹. Le photobioréacteur B (PB) correspond à une culture sous une irradiance de 150 μmol de photons.m⁻².s⁻¹ dans le milieu f/2 modifié (supplémenté en azote et en phosphore). Enfin, le photobioréacteur C (PC) correspond aux conditions de culture optimales de la microalgue déterminées par l'étude de la photosynthèse, sous irradiance de 420 μmol de photons.m⁻².s⁻¹ et avec le milieu f/2 modifié. L'évolution de la biomasse, de la consommation de nitrates et de la production d'EPS sont suivis pour les différentes cultures. Les résultats obtenus sont synthétisés dans la Figure 61.

Résultats et discussion

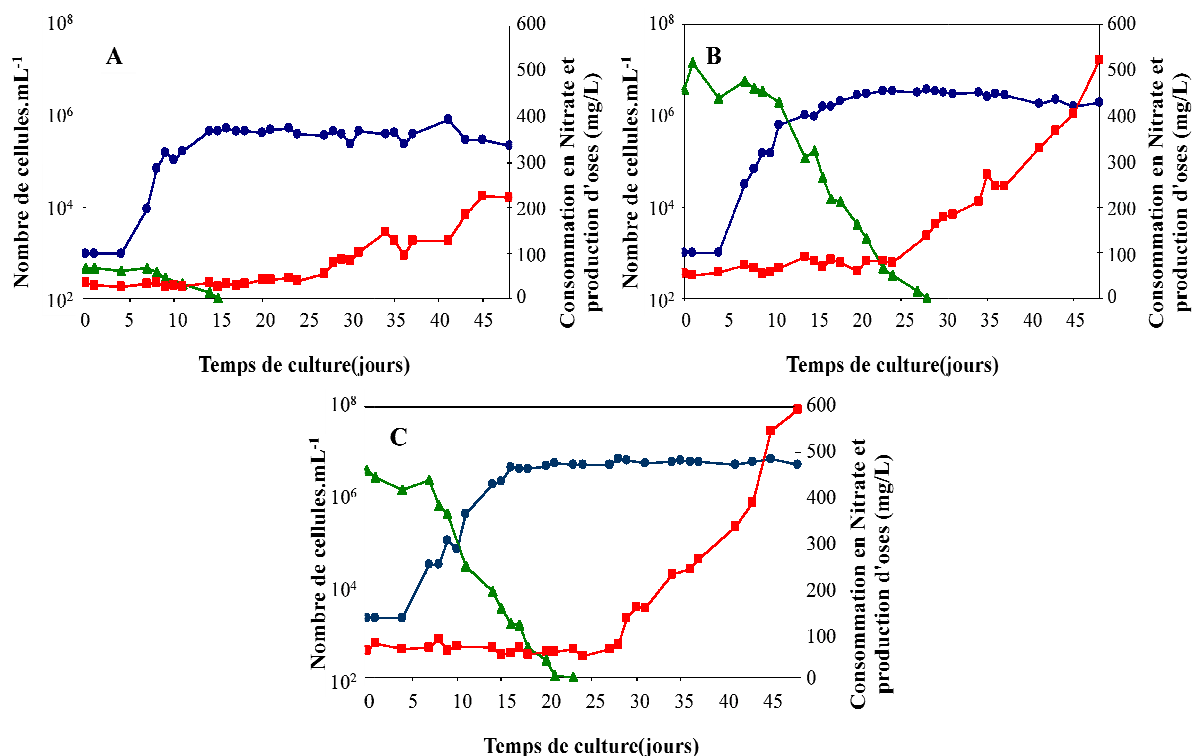


Figure 61 Croissance (-●- cellules.mL⁻¹), consommation de nitrate (-▲- mg.L⁻¹) et production d'oses extracellulaires (-■- mg.L⁻¹) par *Rhodella violacea* LMGEIP 001 dans les photobioréacteurs PA (A), PB (B) et PC (C).

Le profil de croissance des microalgues est similaire à celui d'autres microorganismes, avec une phase de latence, une phase exponentielle de croissance et une phase stationnaire. Pour les trois conditions testées la durée de la phase de latence est la même, soit 5 jours. La durée de la phase de latence ne dépend pas des conditions de culture mais de l'état physiologique des cellules. Les inocula étaient identiques et tous issus d'une même culture pour les trois conditions. Il est par conséquent normal que les cellules soient dans le même état physiologique.

Lors de la phase de croissance les microalgues se multiplient avec les taux de croissance suivant :

- $\mu_{PA} = 0,0343 \text{ h}^{-1}$
- $\mu_{PB} = 0,0312 \text{ h}^{-1}$
- $\mu_{PC} = 0,0287 \text{ h}^{-1}$

Le taux maximal de croissance (ou vitesse spécifique de croissance) qui représente l'accroissement des microalgues par unité de temps est équivalent pour les différentes conditions de culture, qui ont un temps de génération compris entre 20 et 24h.

Résultats et discussion

Le taux de croissance correspond à ceux d'autres microalgues rouges telles *Rhodomonas sp.* qui croît en culture en fiole conique avec une durée de phase exponentielle de 4 à 7 jours et un taux de croissance compris entre 0,029 et 0,032 h⁻¹ (Da Silva *et al.*, 2009).

L'entrée en phase stationnaire est la conséquence de la diminution de la quantité d'azote disponible dans le milieu qui ne permet plus la synthèse de protéines. La carence en azote conduit à un ralentissement de la croissance jusqu'à l'arrêt de la multiplication des microorganismes. Chez de nombreuses microalgues, cet arrêt de la croissance lors d'une carence en nitrate est associée à une production d'EPS (Ho *et al.*, 2012, Da Silva *et al.*, 2009). La croissance et la production de polysaccharide sont optimales pour le milieu f/2 modifié, sous irradiance optimale (420 µmol de photons.m⁻².s⁻¹). Dans ces conditions de culture, la production de biomasse est multipliée par un facteur 15 et la production d'EPS par un facteur 5 par rapport aux conditions standards de culture. De plus, l'augmentation de l'irradiance de 150 à 420 µmol photons.m⁻².s⁻¹ permet d'augmenter la biomasse cellulaire finale par 2 lorsque le milieu f/2 modifié est utilisé.

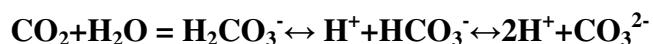
Les mêmes résultats sont retrouvés pour les cultures de *P. cruentum* où la croissance cellulaire est la plus forte sous une irradiance optimale de 70 µmol de photons.m⁻².s⁻¹. Le fait d'augmenter l'irradiance de 39 à 70 permet d'augmenter la production de polysaccharide par un facteur 5 avec une augmentation par un facteur 2 de la croissance cellulaire (You et Barnett 2004).

Les valeurs en biomasses sèches des différentes cultures de la souche *Rhodella violacea* obtenue sont de 0,26 ; 1,3 et 1,6 g.L⁻¹ de milieu de culture pour respectivement PA, PB, et PC. La valeur de biomasse théorique attendue était de 1 g.L⁻¹. Cette valeur de 1 g.L⁻¹ est dépassée pour les réacteurs PB et PC qui utilisent le milieu de culture optimisé. Ce résultat peut s'expliquer par une teneur en eau importante de la matière sèche riche en polysaccharides hydrophiles (Arad et Levy-Ontman, 2010) mais également par un apport d'éléments minéraux par l'inoculum ou une différence sensible de la composition C-molaire dans le cas d'une production d'exopolysaccharides (contenus en azote et en soufre faibles).

Le pH varie au cours des cultures de microalgues, et celui-ci n'est pas régulé dans les photobioréacteurs de faible volume (en fiole de Roux). Le pH régule la distribution des espèces carbonées présentes en solution. Le dioxyde de carbone injecté dans le milieu de culture entraîne la formation de quatre types de molécules carbonées : CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ et

Résultats et discussion

CO_3^{2-} dissous dans l'eau. Le CO_2 injecté au sein du réacteur a donc tendance à acidifier le milieu de culture des microalgues par l'augmentation de la quantité de protons :



La multiplication des cellules en croissance diminue la teneur en CO_2 et a tendance à alcaliniser le milieu de culture. Par conséquent, les variations de pH sont parallèles au développement des microorganismes. En phase de croissance, le pH augmente puis il se stabilise en phase stationnaire.

3.3.2. Culture en photobioréacteur de 5 L

Les modifications apportées au niveau de la composition du milieu et les conditions optimales d'activité photosynthétique ayant été validées, un photobioréacteur de 5 L a été réalisé sur une durée de 35 jours (Figure 62) en utilisant ces paramètres de culture.

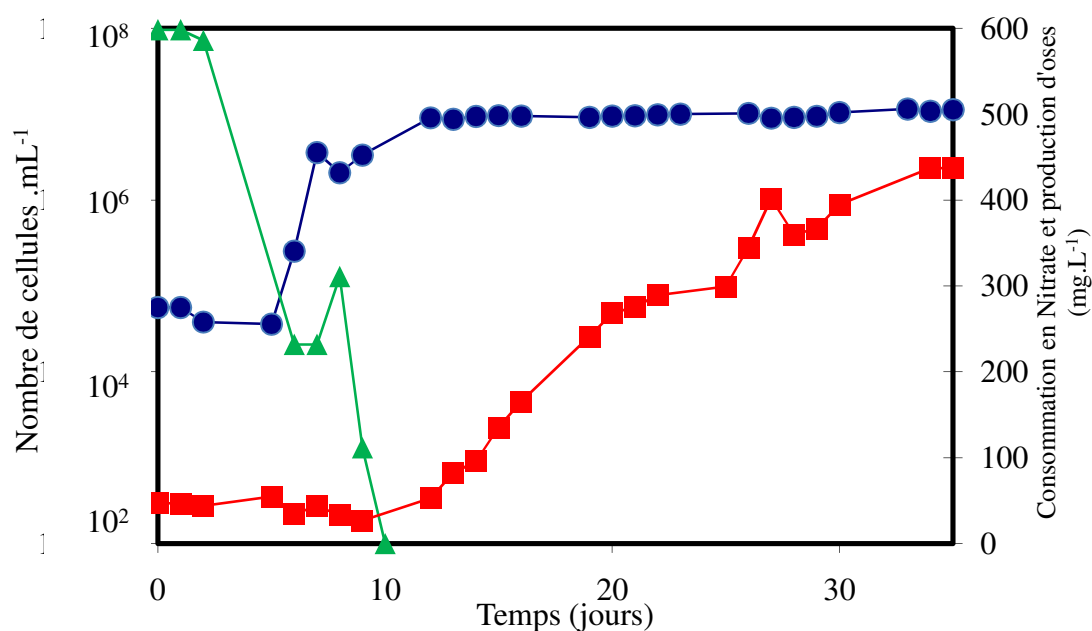


Figure 62 Croissance (-●- cellules.mL⁻¹), consommation en nitrate (-▲- mg.L⁻¹) et production d'oses extracellulaires (-■- mg.L⁻¹) par *Rhodella violacea* dans le photobioréacteur de 5 L PC' (milieu f/2 modifié).

La phase de latence est de 5 jours, elle a une durée identique à celle obtenue dans les photobioréacteurs de 600 mL.

Résultats et discussion

Tableau 9 Croissance cellulaire et production de polysaccharides par *Rhodella violacea* cultivée dans les photobioréacteurs PA, PB, PC et PC'.

	PA	PB	PC	PC'
Taux de croissance (h^{-1})	0,034	0,031	0,029	0,096
Biomasse (g.L^{-1})	0,26	1,30	1,60	2,60
Nombre final de cellules. $10^6.\text{mL}^{-1}$	0,40	2,83	5,98	11,30
Polysaccharide (g.L^{-1})	0,22	0,52	0,59	0,50

La biomasse finale est de $11,3 \cdot 10^6$ cellules. mL^{-1} et le taux de croissance de $\mu=0,096 \text{ h}^{-1}$ (Tableau 8). En fin de culture 2,60 g de polysaccharides lyophilisés sont obtenus après extraction soit une concentration de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de polysaccharides. La concentration cellulaire dans ce photobioréacteur est donc 2 fois supérieure à celle obtenue dans le photobioréacteur de faible volume (600 mL) PC (culture de *Rhodella* dans des conditions équivalentes) qui n'est que de $5,9 \cdot 10^6$ cellules. mL^{-1} .

Le photobioréacteur cylindrique permet une culture optimale des microalgues. Les pales responsables de l'agitation de la culture et la forme du photobioréacteur permettent un meilleur transfert de CO_2 , ainsi qu'une bonne homogénéisation de la culture. La phase stationnaire est établie après 12 jours de culture. Lorsque les cellules entrent en phase stationnaire elles produisent l'EPS, dont la concentration augmente après 12 jours. Le développement des microalgues est corrélé avec la présence d'azote dans le milieu. Lorsque celui-ci est épuisé, les microalgues en carence d'azote arrêtent leur multiplication.

3.4. Conclusion intermédiaire

La croissance cellulaire et la production d'EPS sont optimales lorsque la photosynthèse est maximale, c'est à dire pour une irradiance de $420 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et avec un milieu f/2 supplémenté en azote et phosphore. La température optimale de croissance est de 24°C avec un pH de 8,3. La supplémentation du milieu permet d'augmenter la quantité de biomasse, ainsi que la production d'EPS. Par ailleurs, la quantité de biomasse cellulaire obtenue lors des cultures en photobioréacteur est toujours supérieure à la valeur attendue d' 1 g.L^{-1} . L'utilisation d'un photobioréacteur de volume important permet de produire une quantité de polysaccharide de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ sur un mois de culture. Dans ces conditions il est possible de produire des EPS de façon importante pour leur caractérisation structurale, physico-chimique et pour la détermination de leurs activités biologiques.

Résultats et discussion

4. Caractérisations structurale et physico-chimique du polysaccharide de *Rhodella violacea* LMGEIP 001

4.1. Caractérisation chimique

4.1.1. Dosages colorimétriques

Les dosages colorimétriques permettent de déterminer la composition globale du lyophilisat issu de l'extraction de l'exopolymère produit par *Rhodella violacea*. Le lyophilisat est blanc et d'aspect cotonneux. Sa solubilisation dans l'eau est difficile au-delà de 1 g.L⁻¹ et la solution apparait comme très visqueuse. Le polysaccharide est placé dans l'eau et laissé sous agitation à 60°C pendant 24 h jusqu'à solubilisation totale.



Figure 63 Exopolysaccharide de *Rhodella violacea* produit en photobioréacteur de 5 L.

L'ensemble des dosages colorimétriques est réalisé à partir d'une solution mère à 0,25 g.L⁻¹. Les dosages ont été exécutés sur les extraits issus des photobioréacteurs PA, PB, PC et PC'. Pour rappel, les conditions PA sont les conditions classiques de culture (milieu f/2 standard et 150 μmol de photons.m⁻².s⁻¹), les conditions PB correspondent au milieu f/2 modifié (supplémenté en azote et phosphore) sous irradiance de 150 μmol de photons.m⁻².s⁻¹ et les conditions PC sont obtenues avec une irradiance optimale (420 μmol de photons.m⁻².s⁻¹) et le milieu f/2 modifié. Enfin, les conditions PC' concernent la production en photobioréacteur de 5 L dans les conditions optimales.

Les résultats obtenus lors des dosages sont résumés dans le Tableau 10.

Résultats et discussion

Tableau 10 Composition globale des polysaccharides extracellulaires de *Rhodella violacea* (% massique) produits sous différentes conditions de culture en photobioréacteur (PA, PB, PC et PC'). Résultats obtenus par dosages colorimétriques.

	PA	PB	PC	PC'
Sulfate	4,25 ($\pm 0,1$)	2,40 ($\pm 0,4$)	5,0 ($\pm 0,05$)	3,0 (± 1)
Protéines	4,32 ($\pm 0,14$)	7,0 ($\pm 0,2$)	6,50 ($\pm 0,7$)	6,0 ($\pm 0,3$)
Oses totaux	42,0 ($\pm 0,5$)	54,4 ($\pm 0,9$)	46,8 ($\pm 0,7$)	47,3 (± 6)
Oses neutres	33,8 ($\pm 0,6$)	40,0 ($\pm 0,5$)	33,0 ($\pm 0,9$)	37,8 (± 4)
Ac. uroniques	8,30 ($\pm 1,1$)	14,4 ($\pm 0,4$)	15,6 ($\pm 0,8$)	9,50 (± 4)

Les teneurs en oses, sulfate et protéines varient peu avec les conditions de culture de *Rhodella violacea*. Le produit extrait des surnageants de culture contient 42 à 54% d'oses totaux (exprimés en équivalent glucose) dont une majorité d'oses neutres (33 à 40%). Cette pureté apparemment faible peut facilement s'expliquer par les différences de coefficients d'extinction molaire entre les oses constitutifs du polymère extrait et celui du glucose utilisé comme monosaccharide standard pour étalonner le dosage. Il s'agit donc d'un hétéropolymère sulfaté à hauteur de 3% et contenant 6% de protéines. Ces résultats sont en concordance avec ceux d'Evans (1970). L'auteur a en effet analysé le produit issu du milieu de culture de la souche *Rhodella violacea* et identifié un extrait contenant 50% d'oses, 10% de sulfates et 16% de protéines. Cette forte teneur en protéines a conduit à l'utilisation du terme proteoglycane pour désigner l'exopolymère produit par certaines espèces de *Rhodella*, terme repris depuis par d'autres auteurs (Capek *et al.*, 2008). D'autres microalgues rouges ont un EPS de composition rappelant celle obtenue pour l'EPS de *Rhodella violacea*. Ainsi, les EPS de *Dixoniella grisea* et de *Porphyridium (cruentum et purpureum)* sont également des polymères sulfatés. Ils contiennent 5 à 10% de sulfates (Geresh *et al.*, 2002 ; Gloaguen *et al.*, 2000 ; Thepenier et Gudin, 1985). On attribue à certains d'entre eux comme ceux produits par *Dixoniella grisea*, une partie protéique représentant environ 15% de la masse totale de l'exopolymère (Capek *et al.*, 2008). Des quantités plus faibles de protéines (5,5%), équivalentes à celles obtenues avec l'exopolymère de *Rhodella violacea* LMGEIP 001, sont observées chez *Porphyridium sp.* (Gloaguen *et al.*, 2004).

4.1.2. Composition monosaccharidique

La composition en monosaccharides de l'exopolymère produit par la souche *Rhodella violacea* LMGEIP 001 a été déterminée par chromatographie liquide et gazeuse après hydrolyse acide.

4.1.2.1. Identification des monosaccharides par chromatographie ionique

Il existe différentes méthodes d'hydrolyse des polysaccharides dont l'efficacité varie en fonction du produit à hydrolyser. Par conséquent, il a été nécessaire de déterminer les conditions optimales d'hydrolyse afin d'avoir une représentation la plus proche de la réalité de la composition osidique de cet exopolymère par chromatographie ionique. Trois acides ont été testés : l'ATF (4 et 9 M), l'HCl (2 M) et l'H₂SO₄ (14 M). Les hydrolyses sont conduites en utilisant différentes cinétiques (165, 225, 345, 465, et 705 min pour l'acide sulfurique ; 120, 190, 240, 390, et 480 min pour l'HCl et 120, 240, 480min pour l'ATF). L'ATF ne permet pas une hydrolyse complète du polysaccharide. En effet, après dosage colorimétrique, la quantité d'oses obtenus pour l'hydrolyse au TFA à 9 M pendant 480 min est 20% inférieure à celle obtenue avec l'acide sulfurique à 14 M pendant 345 min.

Les hydrolyses à l'HCl et à l'H₂SO₄ étant les plus performantes, ces deux méthodes ont été utilisées en CEAHP sur l'échantillon de l'EPS de *R. violacea* produit en photobioréacteur PC'. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 64.

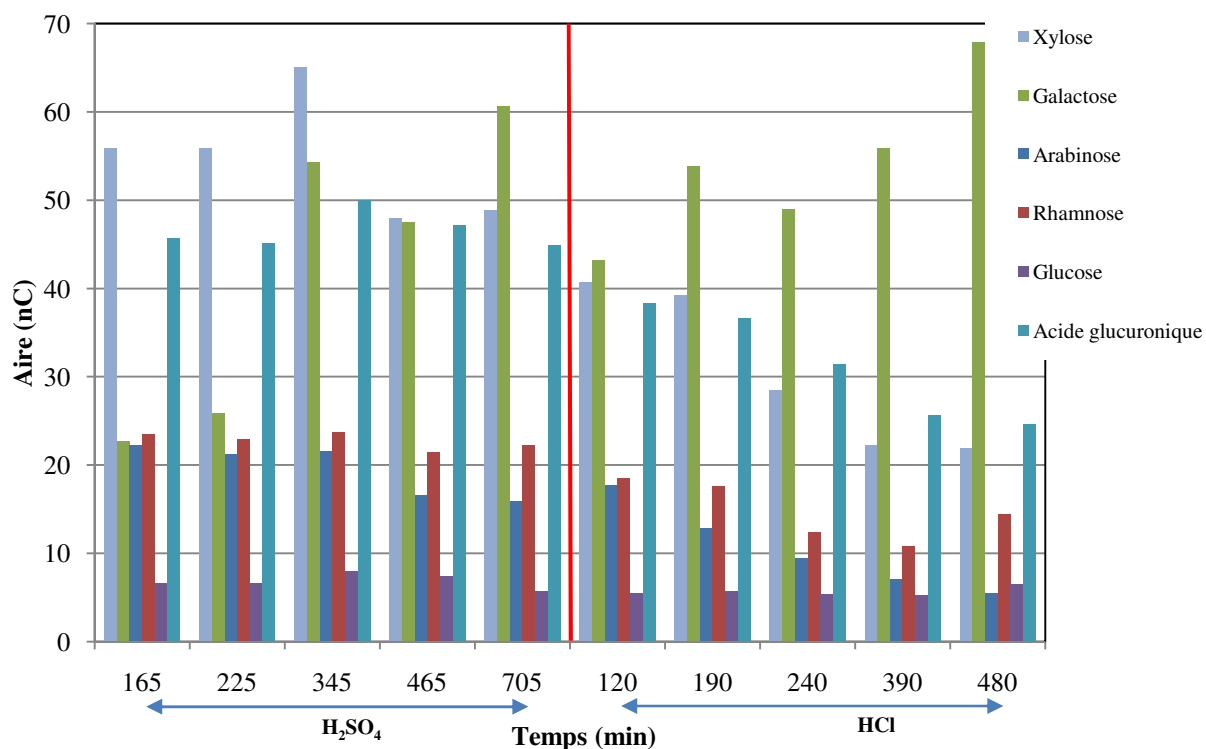


Figure 64 Composition des hydrolysats de l'EPS de *Rhodella violacea* analysés en CEAHP. Hydrolysats obtenus avec de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'acide sulfurique (H₂SO₄).

Résultats et discussion

Les polysaccharides lyophilisés issus des différentes cultures en photobioréacteur (PA, PB, PC et PC') ont donc été hydrolysés 345 min en présence d'acide sulfurique 14 M à 90 °C puis analysés en chromatographie échangeuse d'anions haute performance après neutralisation. Les monosaccharides constitutifs du polymère ont par la suite été identifiés et quantifiés (Tableau 11).

Tableau 11 Caractérisation par CEAHP des exopolysaccharides produits par *Rhodella violacea* LMGEIP 001 extraits des milieux de culture des photobioréacteurs PA, PB, PC et PC'. Résultats exprimés en % massique.

	PA	PB	PC	PC'
Xylose	32,8 (±n.d.)	43,3 (±n.d.)	33,9 (±n.d.)	15,9 (±0,01)
Arabinose	6,16 (±0,2)	3,07 (±0,02)	3,76 (±1,3)	3,02 (±0,10)
Rhamnose	8,95 (±0,9)	10,6 (±1,3)	7,61 (±3,0)	4,39 (±0,19)
Galactose	4,36 (±0,3)	5,01 (±0,3)	3,46 (±2,6)	3,57 (±0,35)
Glucose	3,38 (±0,6)	2,31 (±0,04)	3,57 (±2,3)	4,90 (±0,05)
Ac. Glucuronique	4,85 (±0,8)	6,23 (±1,03)	4,74 (±4,1)	5,69 (±0,64)

n.d. : non déterminé

Les exopolymères obtenus avec les conditions de culture PA, PB et PC ont une composition monosaccharidiques stable. Toutefois, les résultats obtenus pour le polymère extrait du photobioréacteur de 5 L (PC') sont sensiblement différents. Ce polymère contient en effet moins de xylose (15%). Cette variation de composition a déjà été décrite dans la littérature comme étant dépendante des conditions d'extraction et de purification. En effet, Rahaoui (1999) a extrait l'EPS de *R. violacea* avec du CTAB ou de l'éthanol. Les quantités de xylose, de glucose et d'acide uronique identifiées dans les polymères issus des deux extractions étaient apparues comme sensiblement différentes avec une teneur en xylose et en acides uroniques plus importante lors d'extractions au CTAB. A contrario, la teneur en glucose était supérieure pour le polymère extrait par précipitation alcoolique. Cependant, les analyses issues de ce travail portant sur des polymères extraits et analysés de la même façon, il n'est pas possible d'imputer les variations de composition en monosaccharides à des différences dans les procédures d'extraction. Une explication envisageable pourrait être liée aux différences entre les deux types de culture. En effet, la culture réalisée en photobioréacteur de 5 L est moins âgée que celle réalisée en photobioréacteur de 600 mL (35 jours contre 45).

Le xylose reste le monosaccharide majoritaire de l'exopolymère produit par *R. violacea* LMGEIP 001 quel que soit le mode de culture utilisé. Il est donc possible de le qualifier

Résultats et discussion

d'hétéroxylane sulfaté. Ces résultats sont semblables à ceux d'autres auteurs pour la composition des EPS de microalgues rouges.

Les microalgues rouges produisent des exopolymères riches en xylose (40 à 55% (m/m) des monosaccharides détectés). Ainsi, Capek *et al.*, (2008) ont observé chez *Dixoniella grisea* un EPS principalement composé de xylose (29,3% de xylose et 26% de 3-O-méthylxylose) et contenant du rhamnose (14,4 %), des acides uroniques (17,1 %) et du galactose (7,5 %) deux fois plus représenté que le glucose (3,9 %). Toutefois, le polymère décrit n'est pas sulfaté. La composition de l'EPS de *Rhodella violacea* est proche de celles des microalgues rouges appartenant au genre *Porphyridium* qui contiennent également une majorité de xylose (25,3%) mais pour lesquels les quantités de galactose (16,6%) et de glucose (14,1%) sont plus importantes (Geresh *et al.*, 2002).

La composition en monosaccharides obtenue en CEAHP a été confirmée par une analyse en CPG/SM.

4.1.2.2. Identification des monosaccharides par Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

L'hydrolyse acide totale du polymère permet la libération des différents monosaccharides constitutifs de l'EPS de *R. violacea*. Chaque monomère libéré est alors présent sous forme d'un mélange de monomères cycliques (la présence de monomères ouverts est négligeable) sous forme pyrane et furane, dont les deux anoméries (α et β) sont variables. L'équilibre mutarotationnel des monomères conduit à la formation de multiples pics après triméthylsilylation (DeJongh *et al.*, 1968 ; Kamerling 2007 ; Montreuil *et al.*, 1963). Les monosaccharides issus de l'hydrolyse acide ont ensuite été triméthylsilylés via l'utilisation du BSTFA/TMCS (99 : 1) en milieu alcalin (pyridine) avant d'être analysés en CPG/SM. On parle alors de triméthylsilylation directe. Cette méthodologie est adaptée de la procédure de Kamerling *et al.*, (1975) et modifiée par Montreuil *et al.*, 1986 (Figure 43) qui consiste en une méthanolyse (hydrolyse acide HCl en présence de méthanol) suivie d'une triméthylsilylation. Cette technique permet de substituer les protons des groupements hydroxyle engagés dans les liaisons glycosidiques au cours de l'hydrolyse acide par des groupements méthyle (marquage des liaisons).

La Figure 65 présente les résultats obtenus après hydrolyse acide et triméthylsilylation directe de l'EPS de *Rhodella violacea* LMGEIP 001. Les voies de fragmentation en impact électronique (70 eV) des glycosides-O-triméthylsilylés sont largement décrites dans la

Résultats et discussion

littérature (Figure 66) (DeJongh *et al.*, 1968 ; Kamerling 2007). Ainsi, les rapports de masse/charge 204 et 217 sont des fragments importants à prendre en considération. En effet, un rapport m/z 204/217 proche et/ou supérieur à 1 est un bon indicateur de la présence d'un cycle pyranique. A l'inverse un rapport m/z 204/217 très largement en dessous de 1 indiquera la présence d'un cycle furanique (DeJongh *et al.*, 1968 ; Kamerling 2007). L'intensité du fragment m/z 217 sera donc très importante pour un monosaccharide sous forme furanique.

On constate ainsi que tous les monomères constitutifs du polymère de *Rhodella violacea* sont présents sous forme pyranique à l'exception du L-arabinose. Par ailleurs, de multiples pics ont été classiquement obtenus pour un même monosaccharide en raison de l'équilibre mutarotationnel initial des solutions pendant l'hydrolyse acide. A titre d'exemple, la détermination des formes anomériques α et β nécessiterait d'analyser au préalable les standards anomériques purs. Les différents monosaccharides identifiés sont le D-xylose (19,1%), le D-glucose (5,2%), le L-rhamnose (4,6%), le L-arabinose (3,1%) et le D-galactose (4,3%) (Tableau 12).

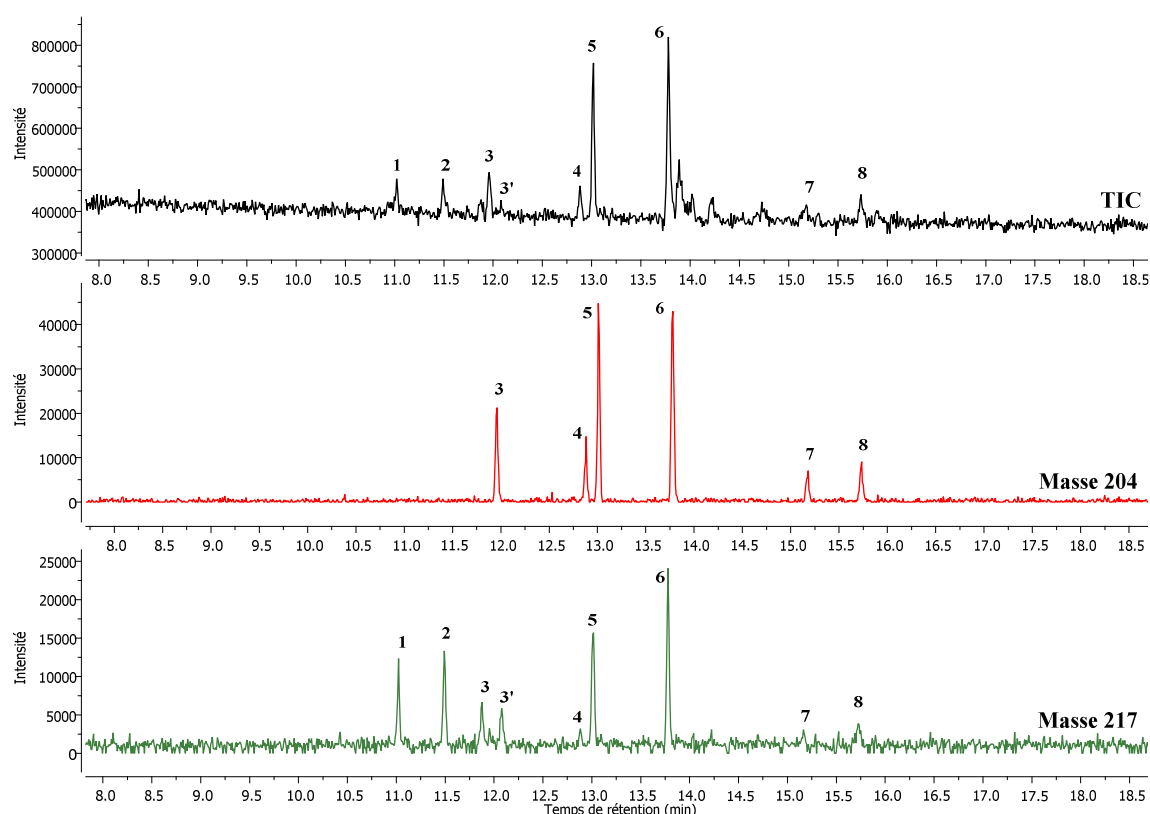


Figure 65 Composition en monosaccharides de *R. violacea* LMGEIP 001 déterminée par CPG/SM (70 eV) après hydrolyse et traitement au BSTFA-TMCS. TIC : Total Ion Chromatogram. Les pics obtenus correspondent aux monosaccharides initiaux suivants : 1, 2 : L-arabinofuranose, 3, 3', 4 : D-rhamnopyranose, 5, 6 : D-xylopyranose, 7 : D-galactopyranose, 8 : D-glucopyranose.

Résultats et discussion

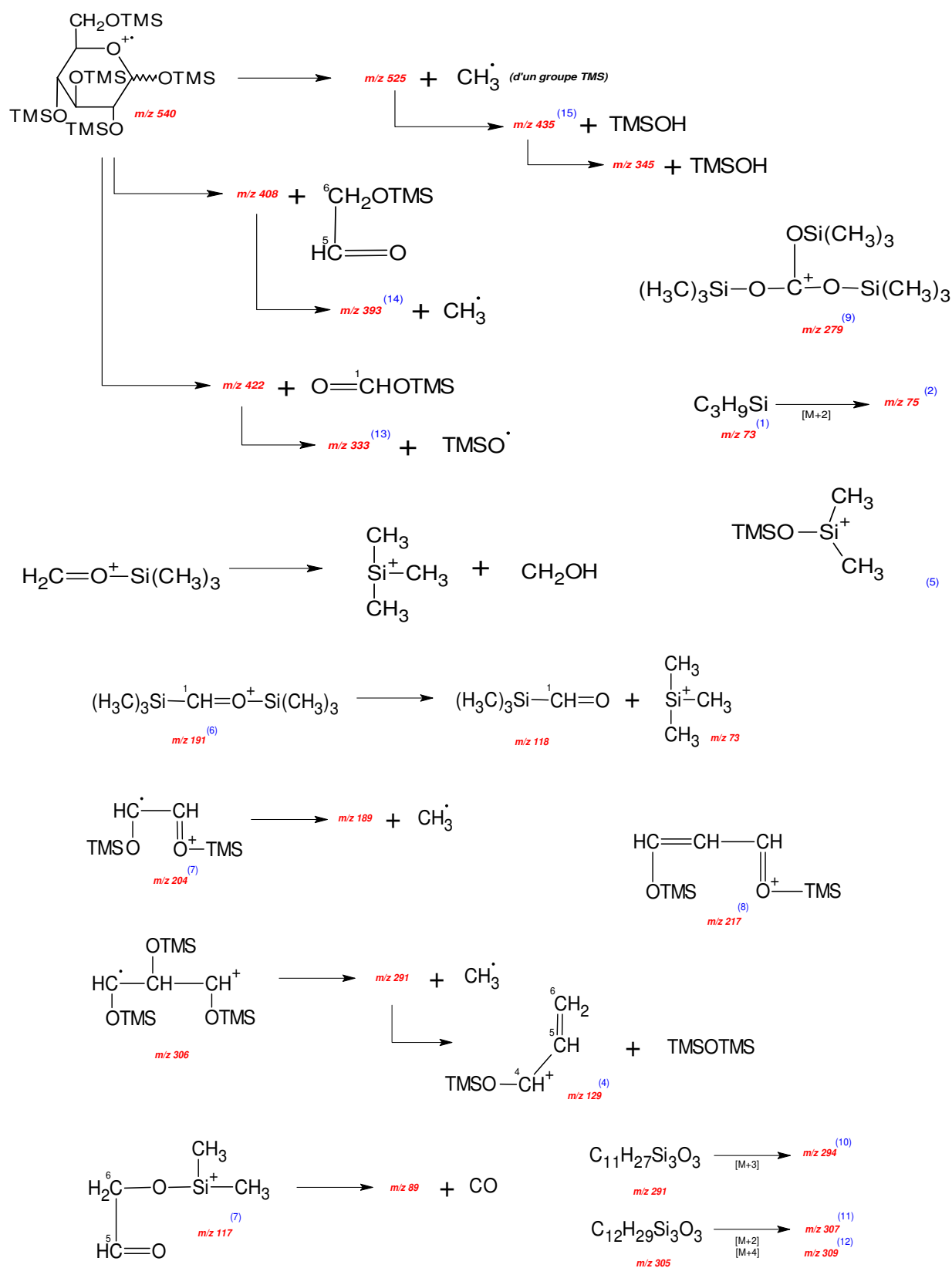


Figure 66 Voies de fragmentation de dérivés O-triméthylsilylglycosides par CPG/SM en Impact Electronique (EI, 70 eV).

Résultats et discussion

Tableau 12 Composition en monosaccharides de l'exopolysaccharide extrait du milieu de culture de photobioréacteur PC' produit par *Rhodella violacea* (% massique). Résultats obtenus par GC/MS après triméthylsilylation (TMS) et formation d'acétates d'alditols (AA) de l'hydrolysate acide (HCl) de l'exopolymère.

	TMS	AA
Xylose	19,1 (\pm 1,3)	22,1 (\pm 2,6)
Arabinose	3,1 (\pm 0,4)	3,7 (\pm 0,9)
Rhamnose	4,6 (\pm 1,2)	4,1 (\pm 1,1)
Galactose	4,3 (\pm 0,8)	3,3 (\pm 0,8)
Glucose	5,2 (\pm 0,9)	4,1 (\pm 0,9)
Ac. Glucuronique	n.d.	4.2 (\pm 0,3)

n.d. : non déterminé

Par cette méthode, il est difficile d'identifier la présence d'un acide uronique. La première raison est liée à la haute stabilité de la liaison uronosidyle en cours de l'hydrolyse acide (Timell *et al.*, 1965) qui est à l'origine d'un réarrangement protecteur engageant le groupement carboxylique en position 6 (Figure 43). De plus, la substitution du proton engagé sur le groupement carboxylique par un résidu triméthylsilylé est plus difficile et souvent variable. Une étape de réduction permet de contourner le problème. La Figure 67 présente donc les résultats obtenus après réduction et acétylation sous forme d'acétates d'alditols (AA) des monosaccharides issus de l'hydrolyse acide totale.

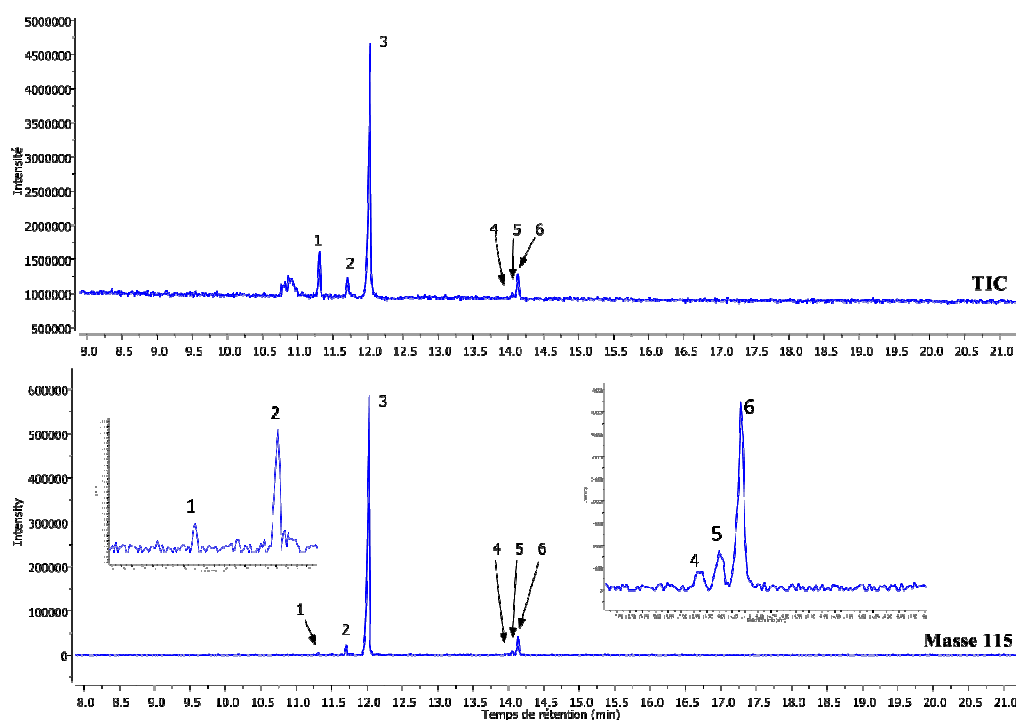


Figure 67 Composition en monosaccharides de *R. violacea* LMGEIP 001 déterminée par CPG/SM-IE (70 eV) après hydrolyse et formation d'acétates d'alditols. TIC : Total Ion Chromatogram 1 : arabitolpentaacétate, 2 : rhamnitol pentaacétate, 3 : xylitolpentaacétate, 4 : glucuronocitolpentaacétate, 5 : galactitol hexaaxétate, 6 : glucitolhexaaxétate.

Résultats et discussion

Tout comme précédemment, les voies de fragmentation en impact électronique (70 eV) des AA sont spécifiques, notamment le fragment de m/z 115 (Figure 68) (DeJongh, 1964). On constate ainsi la présence de plusieurs pics correspondant chacun à un alditol spécifique.

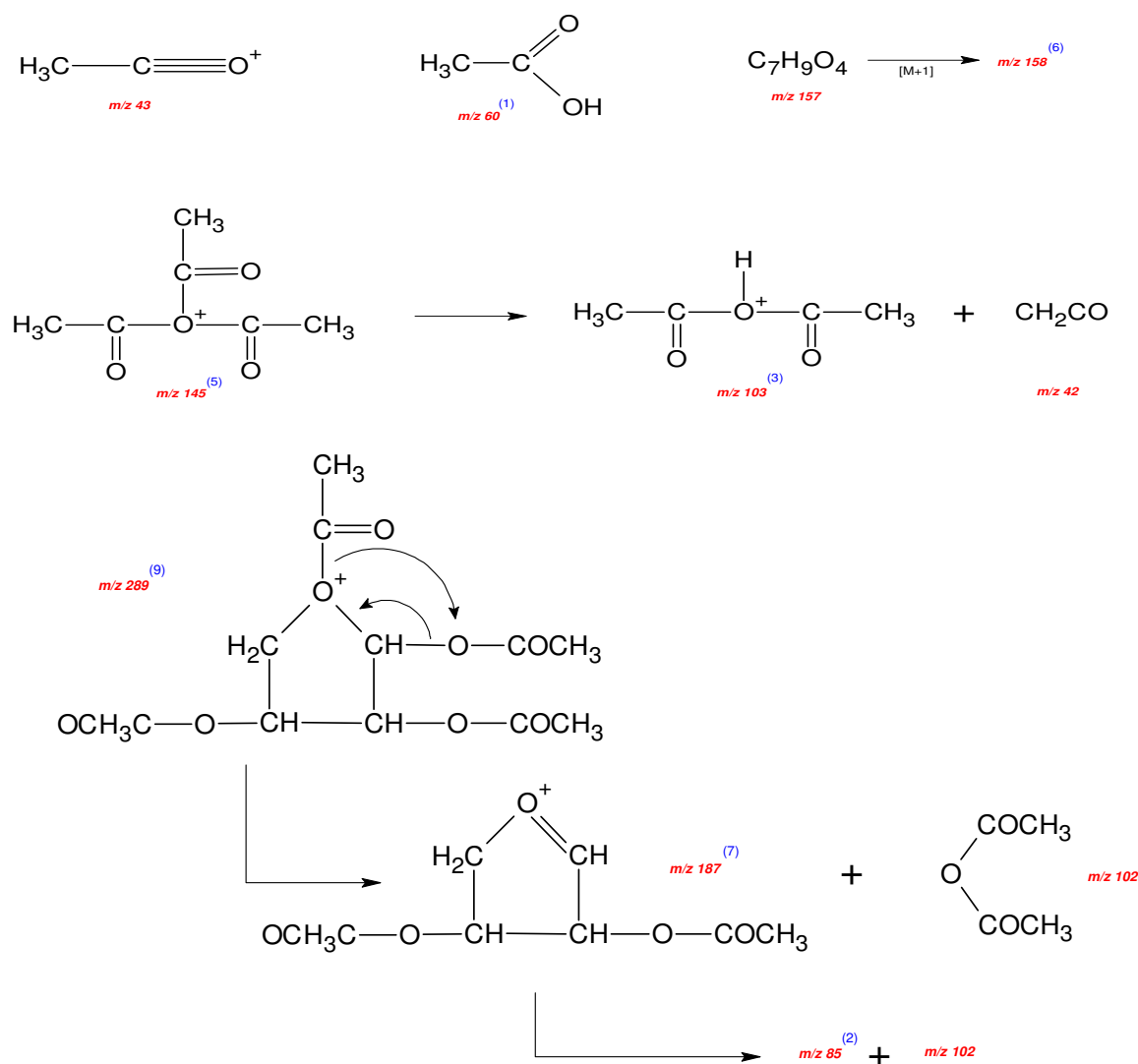


Figure 68 Voies de fragmentation d'acétates d'alditols par CGP/SM en Impact Electronique (EI, 70 eV).

Les différents monosaccharides identifiés par cette technique sont le D-xylose (22,1%), le D-glucose (4,1%), le L-rhamnose (4,1%), le L-arabinose (3,7%), le D-galactose (3,3%) et l'acide D-glucuronique (4,2%) (Tableau 12). On peut noter que cette composition est proche de celle obtenue par triméthylsilylation directe et qu'il a été possible d'identifier et quantifier l'acide glucuronique.

En conclusion, les compositions en monosaccharides déterminées par CEAHP et CPG/SM sont très proches et confirment la prédominance du xylose comme monosaccharide constitutif. L'étude de la composition en liaisons glycosidiques de l'EPS de *R. violacea* a

Résultats et discussion

permis d'identifier le squelette principal composant le polysaccharide (Figure 69). On constate ainsi que les profils chromatographiques (footprints), définis par la présence de PMAA spécifiques aux liaisons glycosidiques composant les polymères, sont très similaires entre un xylane commercial (A), un arabinoxylane (C) et l'EPS de *R. violacea* (B).

La zone numérotée -1-, qui est présente chez les trois polysaccharides, est abondante en fragments 2,3-Me₂-xylp, 2,3,6-Me₃-xylp, 2,4-Me₂-xylp et 2,4,6-Me₃-xylp. On observe également des traces de fragments 3-Me₁-xylp et 4-Me₁-xylp. L'ensemble de ces fragement est caractéristique d'un squelette xylanique. On remarque par ailleurs que les fragments correspondant à une structure du type $\beta(1-4)$ -D-xylp sont plus abondants que les fragments caractéristiques d'une structure $\beta(1-3)$ -D-xylp. On pourrait donc supposer que le squelette principal de l'EPS de *R. violacea* est composé de résidus D-xylopyranose liés par des liaisons $\beta(1-4)$. La mise en évidence de cette structure rappelle la structure de l'EPS de *Porphyridium sp.* décrite dans la littérature (Gloaguen *et al.*, 2004 ; Geresh *et al.*, 2009). Cette microalgue rouge produit un exopolymère riche en D-xylose lié soit à un L-galactose en $\beta(1-4)$, soit à un autre D-xylose par une liaison $\beta(1-4)$ ou en $\beta(1-3)$, soit lié au D-glucose en $\beta(1-3)$. Selon Geresh *et al.*, (2009), l'exopolymère de *Porphyridium sp.* est composé en partie de l'unité de répétition suivante : $[(2 \text{ ou } 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{3)}]_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-}\alpha\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-L-Galp(1}\rightarrow$ qui est rattaché à un squelette principal de structure encore non décrite (Geresh *et al.*, 2009). Par ailleurs, on constate la présence de PMAA correspondant à des fragments 2,4,6-Me₃-hexitol et 2,3-Me₂-rhap (Figure 70, B, -2-). Une partie des hexoses constituant l'EPS pourrait donc être liée au niveau du squelette principal xylanique par leurs carbones anomériques. Les résidus de D-rhamnopyranose pourraient quant à eux être liés par des liaisons de type $(\rightarrow 1)$, $(1\rightarrow 4)$, $(1\rightarrow 6)$, $(\rightarrow 6)$ et servir par exemple de motifs intermédiaires pour les motifs ramifiés. Cette proposition n'est bien évidemment qu'une hypothèse qui nécessite d'être confirmée par une étude structurale plus approfondie par CPG/SM-IE et RMN.

En conclusion et au regard de l'ensemble des données structurales obtenues dans cette partie, il est très probable que l'EPS de *R. violacea* soit un hétéroxylane sulfaté.

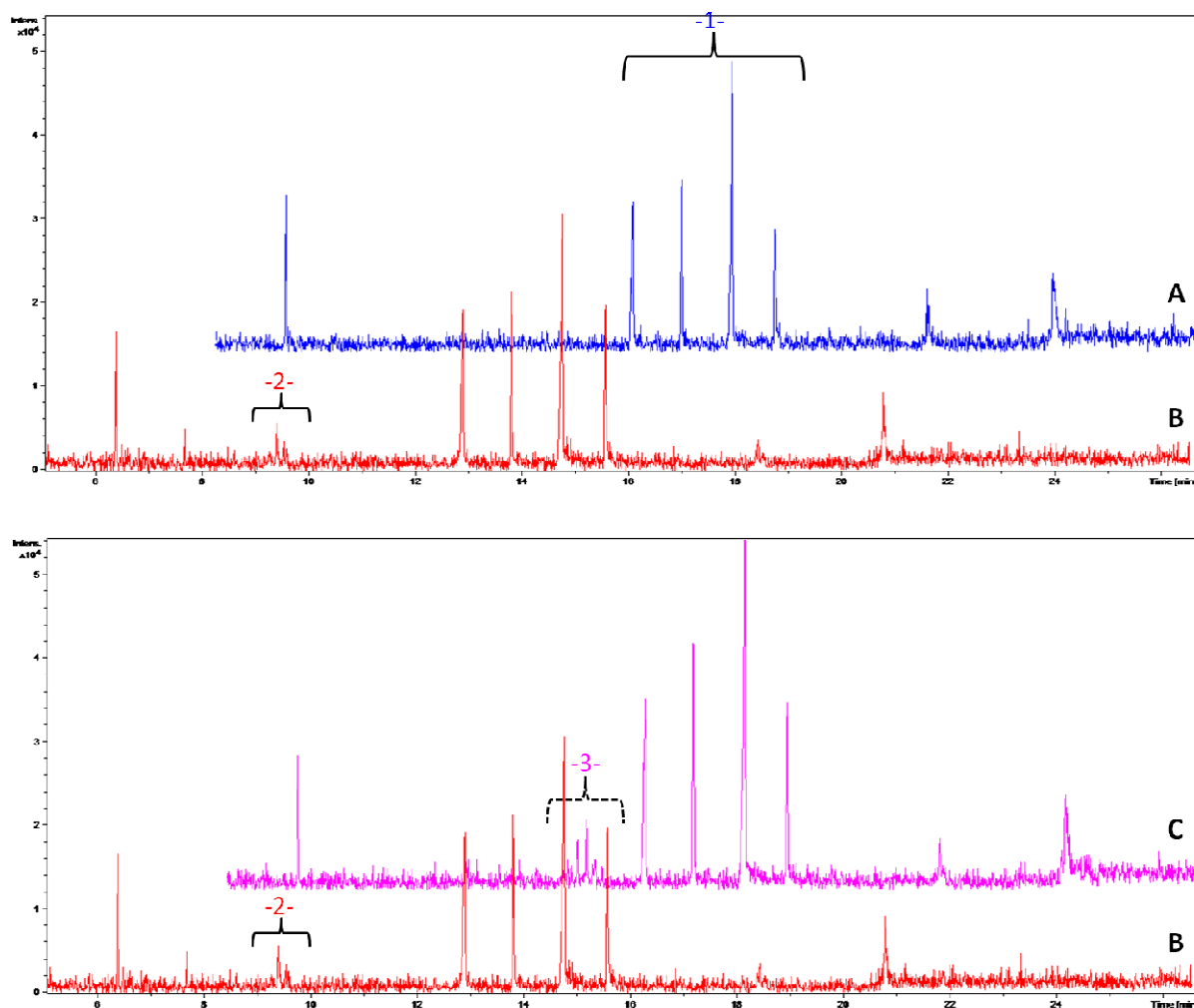


Figure 69 Profils chromatographiques obtenus en CPG/SM-IE (70 eV) des compositions en liaisons glycosidiques (A) d'un xylane commercial, (B) de l'EPS de *R. violacea* LMGEIP 001 et (C) d'un arabinoxylane commercial. Les différents pics correspondent aux PMAA obtenus après dérivation chimique (partie 2.3.3). -1- correspond à la zone des PMAA représentatifs de liaisons $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ -D-xylp ; -2- correspond à la zone des PMAA représentatifs d'araf substitués sur du D-xylp et -3- correspond à des PMAA de type Me₂-rhap et Me₃-hexitol.

4.1.3. Analyse Infrarouge

4.1.3.1. Analyse infrarouge du polysaccharide natif

Le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier permet d'identifier les liaisons et les fonctions chimiques présentes au sein d'une macromolécule complexe. Cette technique donne des informations sur le squelette de base des polymères et sur la présence de groupements fonctionnels tels que les groupements sulfates. En effet la lumière infrarouge entraîne la vibration des liaisons intramoléculaires à des longueurs d'ondes spécifiques, accompagnée par une absorbance de l'énergie lumineuse qui est mesurée par le spectromètre infrarouge.

Résultats et discussion

Les longueurs d'ondes d'absorbance des échantillons dépendent des liaisons et de l'environnement moléculaire.

Le polymère issu de la culture de *R. violacea* en photobioréacteur de 5 L a été désulfaté puis les polysaccharides, natif et désulfaté ont été analysés en infrarouge entre 500 et 4 000 cm^{-1} (Figure 70 et Figure 71).

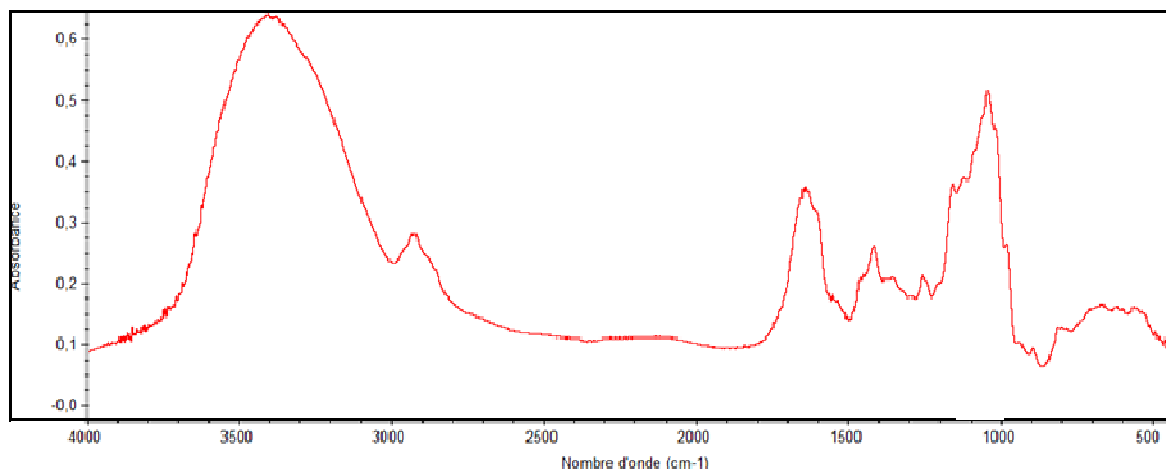


Figure 70 Spectres Infrarouge des exopolymères de *Rhodella violacea* LMGEIP 001 natif.

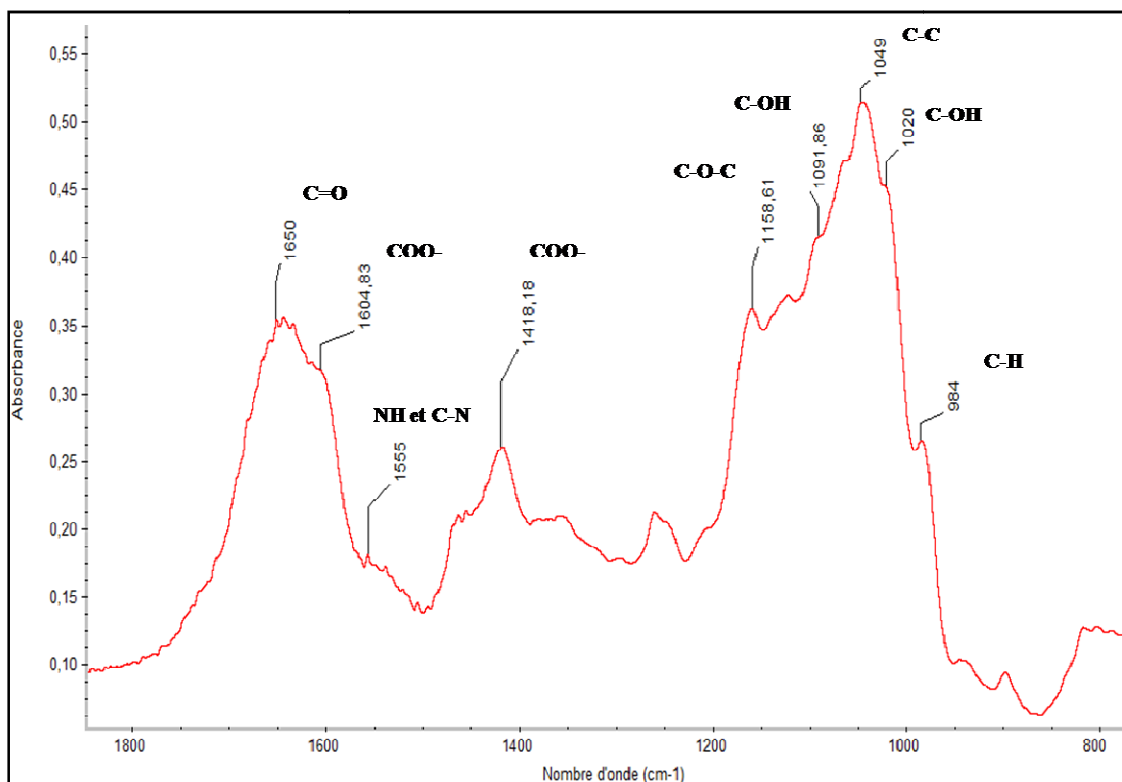


Figure 71 Spectre Infrarouge de l'exopolymère de *Rhodella violacea* LMGEIP 001 natif entre 1 800 et 800 cm^{-1} .

Résultats et discussion

La bande présente entre 3 200 et 3 500 cm^{-1} correspond aux liaisons OH du polymère et des molécules d'eau présentes dans l'échantillon (Maréchal 1997). Les bandes d'absorbance caractéristiques des polysaccharides sont présentes entre 1 200 et 950 cm^{-1} (Kacurakova *et al.*, 2000). Elles correspondent notamment aux vibrations d'élongation des carbones des cycles pyranes des oses (C-C, C-OH, et C-H) identifiées respectivement à 1020, 1 050 et 984 cm^{-1} .

D'après les données obtenues par Kacurakova *et al.*, (2000), la zone d'absorbance située entre 1 170 et 980 cm^{-1} est sensible à la position (axiale ou équatoriale) des groupements hydroxyle des monosaccharides. On peut alors définir des bandes caractéristiques pour le xylose, le glucose et le galactose sous forme pyranose, grâce aux absorbances des groupements hydroxyles et des carbones avoisinant en C2, C3, et C4. Dans notre cas, le pic situé à 1 091 cm^{-1} correspond donc aux vibrations d'élongation des liaisons C-OH. Néanmoins, dans le cadre de notre étude, l'analyse portant sur un polymère et non sur des monosaccharides purs, il n'est pas possible de mettre en évidence les différents monosaccharides constitutifs par cette technique. Enfin, une bande identifiée entre 1 150 et 1 160 cm^{-1} représente l'absorbance des vibrations d'élongation des liaisons osidiques C-O-C mises en jeu au niveau du carbone C1 du cycle (Kacurakova *et al.*, 2000).

L'absorbance dans la zone comprise entre 1 200 et 1 800 cm^{-1} correspond aux composants mineurs de l'exopolymère produit par *Rhodella violacea*, à savoir les protéines et les acides uroniques. Les fonctions amides ont des bandes d'absorbances à 1 650 cm^{-1} pour la vibration d'élongation des liaisons C=O des amides primaires et 1 555 cm^{-1} pour les liaisons N-H et C-N des amides secondaires (liaison peptidique) (Maréchal, 1997 ; Bertrand et Dufour 2000 ; Boulet *et al.*, 2007 ; Marcotte *et al.*, 2007). Le polymère extrait de *R. violacea* possède des bandes d'absorbances à 1 650 et 1 555 cm^{-1} , qui peuvent donc correspondre aux amides primaires et secondaires des acides aminés et protéines.

Les acides uroniques ont des bandes d'absorbance vers 1 600 et autour de 1 420 cm^{-1} caractéristiques des vibrations d'élongation asymétriques et symétriques de la fonction carboxylique déprotonée (COO^-) (Manrique et Lajolo 2002 ; Monsoor *et al.*, 2001 ; Gómez-Ordóñez et Rupérez, 2011). Les bandes d'absorbances à 1 418 et à 1 600 cm^{-1} identifiées sur le spectre IR de l'exopolymère produit par *R. violacea* LMGEIP 001 ont donc été attribuées à la présence d'acides uroniques constitutifs.

Résultats et discussion

4.1.3.2. Analyse Infrarouge du polysaccharide désulfaté

La Figure 72 présente le profil infrarouge du polysaccharide de *Rhodella violacea* natif et après désulfatation.

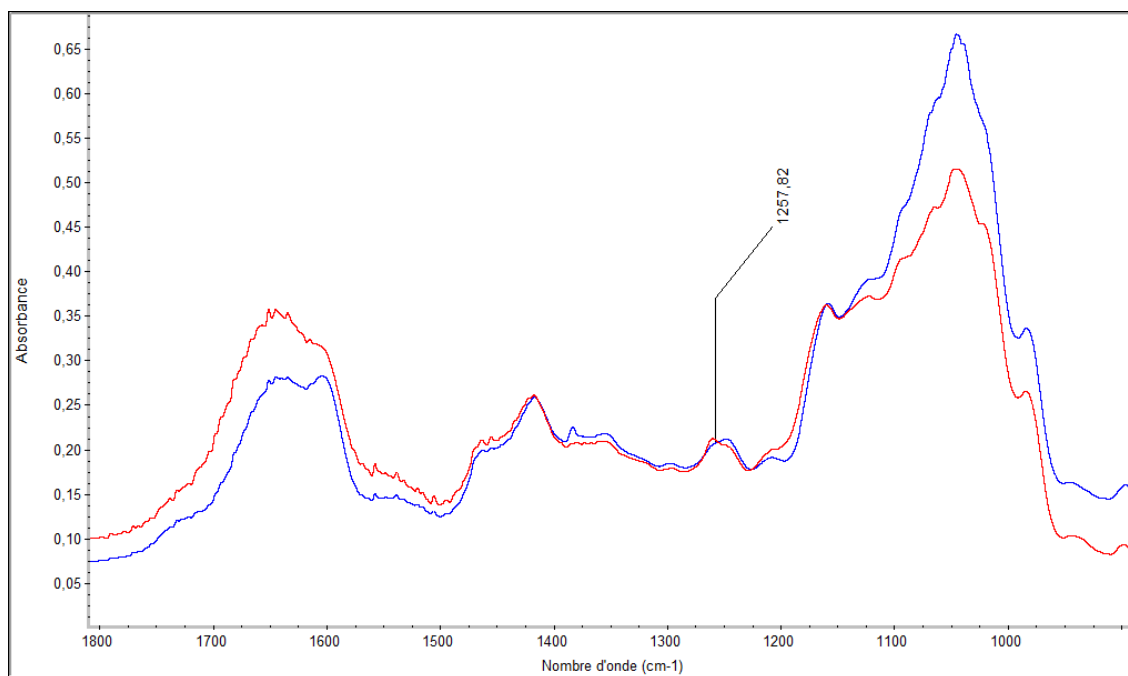


Figure 72 Comparaison des spectres de l'exopolymère de *R. violacea* natif (rouge) et après désulfatation (bleu).

La bande caractéristique des groupements sulfates (S=O) est présente à 1250 cm^{-1} (Liao *et al.*, 1996 ; Loyd *et al.*, 1961) et devrait donc disparaître après désulfatation du polymère. Dans notre cas, les deux spectres présentent un profil infrarouge semblable, probablement dû au faible taux de sulfatation initial. Ainsi, la désulfatation induit une trop faible variation de l'intensité du pic pour être détectable en IRTF. La diminution de la teneur en sulfate a cependant été validée par dosage colorimétrique avec une quantité de sulfate divisée par 40 (de 3% à 0,075%).

4.2. Propriétés physico-chimiques du polysaccharide

4.2.1. Analyse en CES-DLLMA

Le polymère issu de la culture en photobioréacteur PC a été analysé en CES-DLLMA. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces (LPBS) de l'Université de Rouen.

L'exopolymère présentant de nombreux problèmes de mise en solution après séchage ou concentration, une procédure a dû être définie pour son analyse. Un premier échantillon (A) a

Résultats et discussion

été lyophilisé après dialyse à 10 kDa. Un deuxième échantillon (B) est conservé en l'état après dialyse (10 kDa) contre une solution d'azide de sodium 2,5 mM afin d'éviter la prolifération bactérienne. La concentration massique de l'échantillon B a été déterminée à partir de la masse sèche de l'échantillon A (concentration en EPS 6,7 mg.mL⁻¹).

La mise en solution avant analyse de l'échantillon A (7 mg) a consisté en sa mise en suspension dans 1 mL d'eau ultra pure à 80°C. La solution a ensuite été agitée 15 min, avant d'être ajustée à 10 mL avec de l'eau ultra pure à 80°C (0,7 mg.mL⁻¹). Cette solution a été maintenue sous agitation pendant 24 heures à 60°C puis divisée en deux : la solution A non modifiée, et la solution C à laquelle 35 mg de LiNO₃ sont ajoutés afin de reconstituer l'éluant de la chromatographie d'exclusion stérique (LiNO₃ 0,1 M).

Les solutions A, B, C ont été agitées à température ambiante pendant une heure avant analyse pour s'assurer de leur homogénéisation.

Une quatrième solution (solution D) a été réalisée en mélangeant les solutions A, B, et C en quantités équivalentes puis en dialysant l'ensemble (20 kDa) contre une solution de LiNO₃ 0,1 M (2 bains de 2 L).

Les différentes solutions préparées avaient pour objectif de comparer les effets du LiNO₃, de l'eau et de la lyophilisation sur l'EPS de *Rhodella violacea*.

Cent µL de chaque solution (A, B, C, et D) ont été injectés en chromatographie d'exclusion stérique haute pression couplée à une multidétection UV280nm/DLLMA/Viscosimètre/dRI.

Les profils de variation d'indice de réfraction obtenus pour chacun des échantillons sont présentés dans la Figure 73.

Résultats et discussion

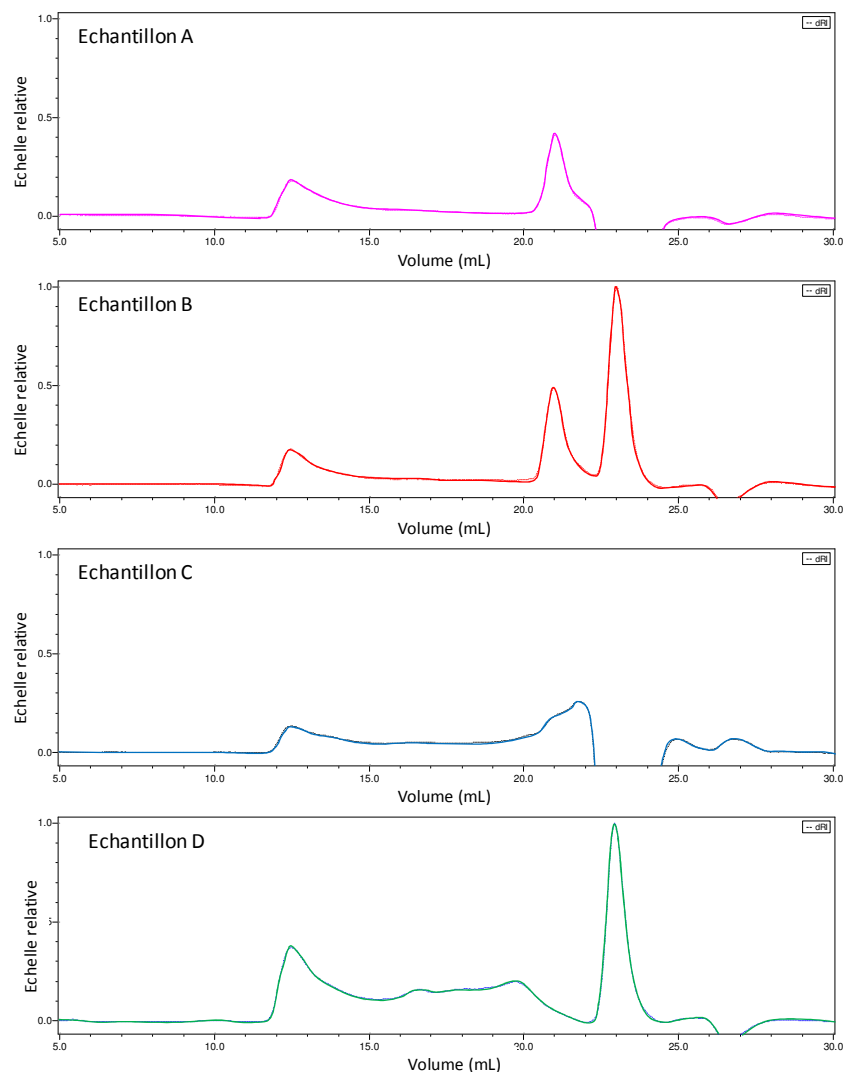


Figure 73 Chromatogrammes d'exclusion stérique haute pression (détection dRI) obtenus à partir des solutions A, B, C et D.

Le profil de masses molaires de l'échantillon D est présenté sur la Figure 74.

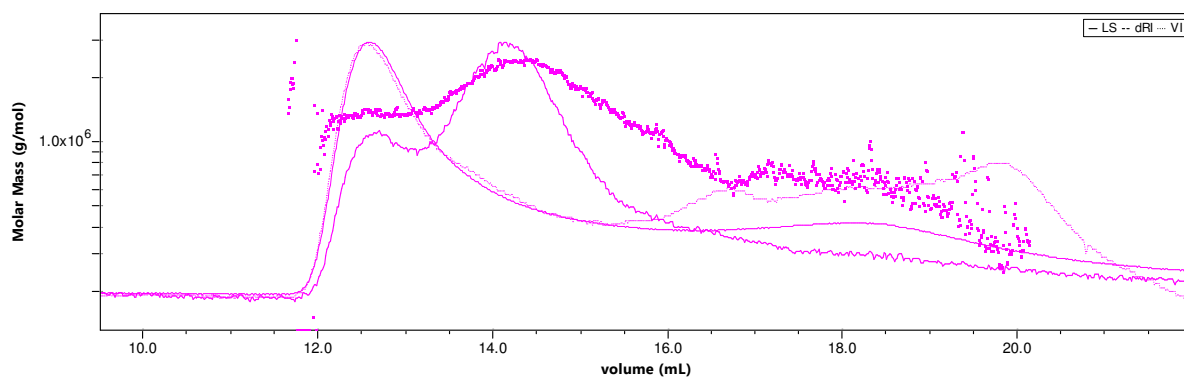


Figure 74 Profil des masses molaire de l'EPS de *R. violacea* de l'échantillon D en sortie de CES-DLLMA. Détection en (—) LS (---) dRI, (•••) moyenne des masse molaire et (...) VI (viscosité intrinsèque). Les masses molaires sont représentées par des points.

Résultats et discussion

Tous les échantillons (A, B, C et D) présentent une population de macromolécule entre 12 et 13 mL d'élution qui correspond à des molécules de haute masse molaire moyenne (M_n) de $1,2 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Les échantillons A et C contiennent des molécules de petites tailles (inférieures à 20 KDa) qui sont éluées entre 20 et 22,25 mL et qui représentent 46% de la masse récupérée lors de l'injection des solutions en considérant un $dn/dc = 0,150$ mL. Ces molécules disparaissent partiellement sur les profils d'élution des échantillons B et D. La dialyse de l'exopolymère est à l'origine de ce phénomène.

Le choix du solvant utilisé pour la mise en solution des échantillons est important puisque celui-ci va entraîner des perturbations au niveau de l'équilibre ionique entre la colonne et la phase mobile. Cette perturbation est visible à partir de 22 mL d'élution (Figure 63) et elle entraîne une variation du signal de réfractométrie (valeur négative) pour les échantillons A et B dont le solvant est l'eau. En revanche, le solvant des solutions C et D (LiNO₃ 0,1 M) entraîne des variations moins intenses, puisqu'il correspond à l'éluant de chromatographie utilisé.

La distribution des masses molaires calculées des fractions éluées reste incertaine du fait de la complexité des solutions à analyser (Figure 74 et Figure 75).

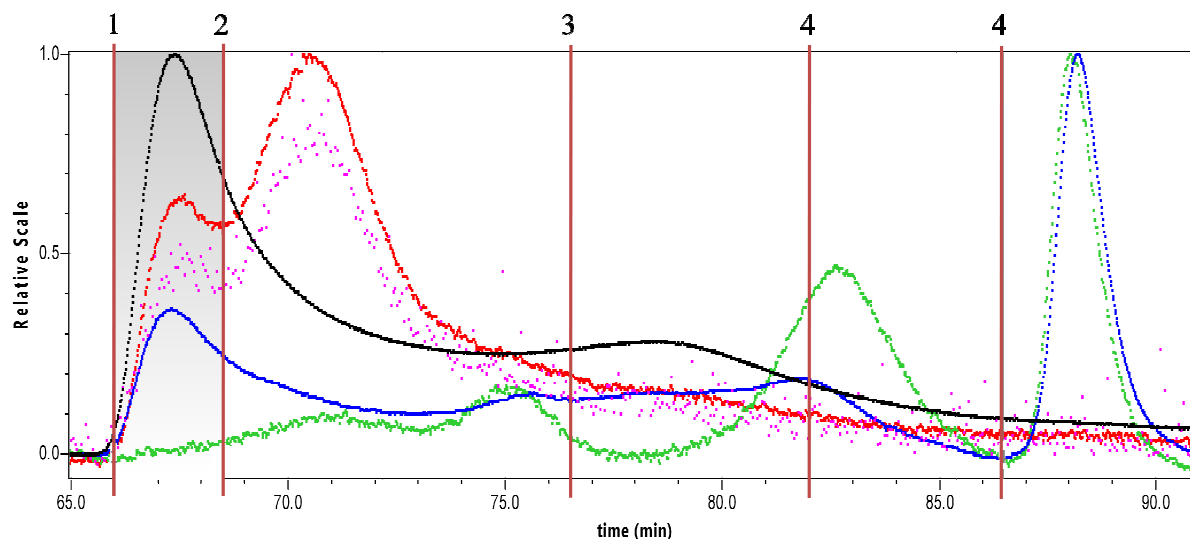


Figure 75 Chromatogramme de l'EPS de *R. violacea* (échantillon D) élué en sortie de CES-DLLMA. Détections en -●-LS, -●-dRI, -●-UV, -●-QELS, et -●-DP. Zone d'élution 1 à 4.

Les zones 1 à 3 (Figure 75) représentent 90% de la masse récupérée (Tableau 13).

Résultats et discussion

Tableau 13 Distribution des masses des molécules constitutives de l'EPS élué en chromatographie CES-DLLMA. Les masses molaires moyennes en nombre (Mn) et en masse (Mw) sont données avec une incertitude de 10 à 30 % pour les zones 1 et 3, et de 5% pour la zone 2. Ip : indice de polydispersité. Rh : rayon hydrodynamique. Rg : rayon de giration.

Zone	Bornes d'élution (mL)	Mn (10 ³ g.mol ⁻¹)	Mw (10 ³ g.mol ⁻¹)	Ip	Rg (nm)	Rh (nm)	Masse récupérée (%)
1	12-13,15	1 220	1 320	1,09	161	75	22
2	13,15-17,25	1 210	1 475	1,21	96	73	38
3	17,25-20	545	590	1,12			30

La fraction éluée en zone 1 entre 12 et 13,15 mL (66 et 68,5 min) contient des molécules de masse molaire moyenne proche de $1,3 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Ces molécules apparaissent moins compactes car leur rayon de giration est plus important que celui de la seconde population éluées en zone 2 entre 13,15 à 17,25 mL (68,5 et 76,5 min) de masse molaire moyenne plus élevée ($1,5 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹) (161 contre 96 nm). Les molécules éluées en zone 3 entre 17,25 et 20 mL (76,5 et 82 min) sont d'une taille deux fois inférieure à celles obtenue en zone 1 et 2 ($0,5 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹). La zone 4, au-delà de 20 mL (82 min), contient des molécules de masses molaires trop faibles (pas de diffusion) pour permettre le calcul des masses molaires moyennes. L'absorbance du polymère à 280 nm (pic situé en zone 1) permet de faire l'hypothèse de la présence d'une partie protéique.

L'exopolymère est donc constitué de 4 populations dont la plus importante fraction possède une masse molaire de $1,2 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Cette masse molaire se rapproche de celle décrite pour le polymère produit par *Porphyridium sp.* dont la masse molaire moyenne est comprise entre $2,3$ et $2,9 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹ (Geresh *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2009).

L'exopolymère produit par les microalgues *R. violacea* apparait donc comme un mélange complexe de polymères de haute masse molaire, ce qui peut suggérer une viscosité élevée. Le comportement rhéologique du polymère de *R. violacea* a donc été analysé.

4.2.2. Analyse rhéologique

Après la caractérisation physico-chimique de l'exopolymère produit par la souche *R. violacea* en milieu dilué, la caractérisation de son comportement rhéologique a été déterminée par mesure de sa viscosité en solution pour plusieurs concentrations.

A toutes les concentrations, la viscosité apparente du polymère diminue avec l'augmentation de la contrainte de cisaillement (Figure 76). Un plateau Newtonien apparait pour les faibles

Résultats et discussion

contraintes de cisaillement. Le polymère a donc un comportement rhéofluidifiant également décrit pour l'EPS de *Porphyridium sp.* (Eteshola *et al.*, 1998).

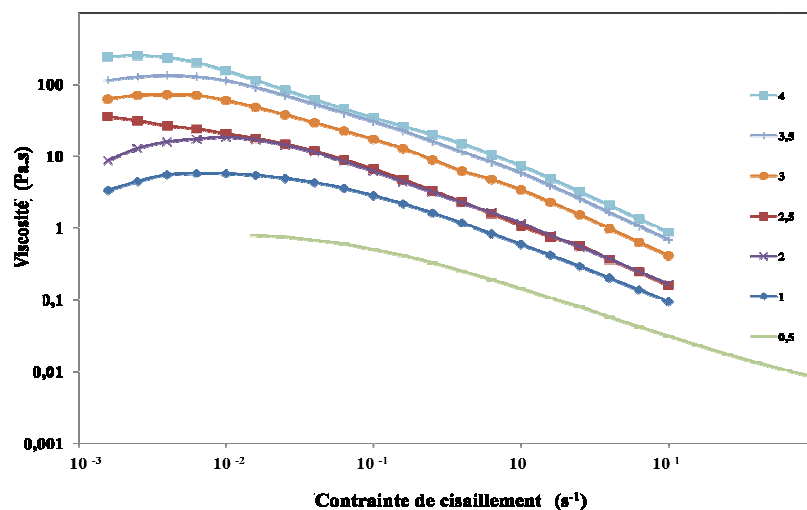


Figure 76 Comportement rhéologique de l'EPS de *R. violacea* à différentes concentrations (0,5 g.L⁻¹ à 4 g.L⁻¹, en solution dans l'eau à 20°C).

Lors d'un second passage dans le rhéomètre immédiatement après analyse, ce plateau Newtonien tend à disparaître, mais il réapparaît après avoir laissé reposer la solution. La contrainte de cisaillement appliquée à la solution, conduit donc à un réarrangement des molécules qui entraîne une résistance réversible de la solution aux forces de déformation (Figure 77).

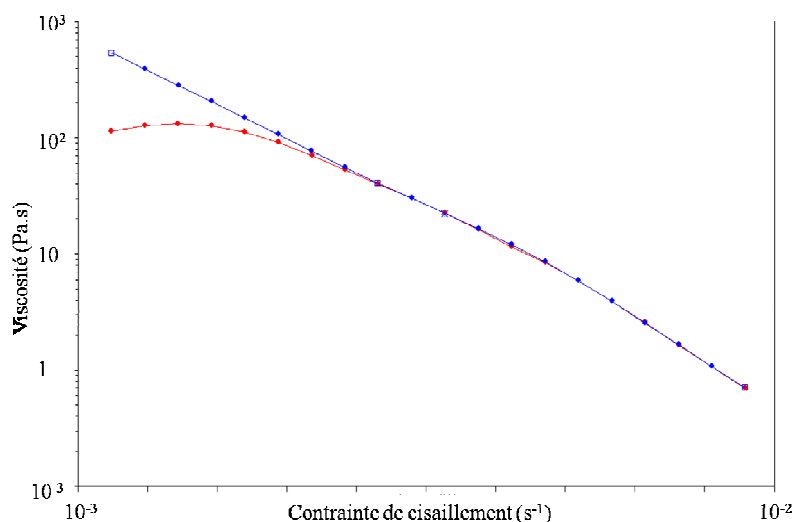


Figure 77 Comportement rhéologique de l'EPS de *R. violacea* à 3,5 g.L⁻¹.

Le comportement est testé en deux étapes : -●- la force de contrainte appliquée successivement de 10⁻³ à 10⁻² puis -●- 10⁻² à 10⁻³.

Résultats et discussion

La concentration critique de recouvrement (C^*) de l'EPS correspond à la valeur seuil de concentration qui délimite la frontière entre les régimes dilué et semi-dilué. La C^* est déterminée en traçant la courbe logarithmique de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en EPS de la solution (Figure 78). La rupture de pente permet de mettre en évidence le début de l'enchevêtrement des molécules à la concentration C^* .

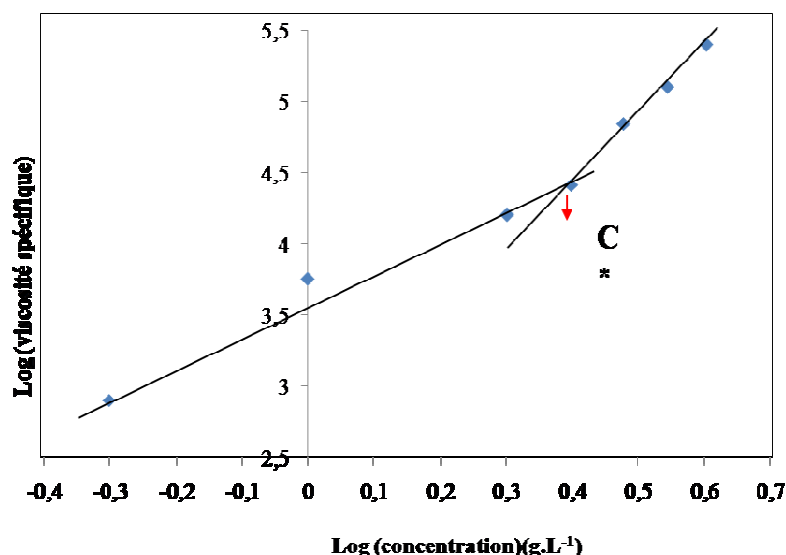


Figure 78 Viscosité spécifique de l'EPS de *R. violacea* en fonction de la concentration, pour la détermination de la concentration critique de recouvrement C^* .

Pour l'EPS de *Rhodella violacea* la rupture de pente se produit à une valeur du C^* de 2,3 g.L⁻¹ (Figure 78). On observe deux droites de pentes différentes : en dessous de la concentration C^* la pente de la droite est de 2,3 Pa.s.g⁻¹.L puis elle est multipliée par deux et passe à 5,4 Pa.s.g⁻¹.L au dessus de la concentration C^* . Cette augmentation de pente conduit, au-delà de la concentration C^* , à une augmentation deux fois plus rapide de la viscosité spécifique qui est multipliée par deux à chaque augmentation de concentration de 0,5 g.L⁻¹. Ainsi, elle passe de 70 à 128 Pa.s de 3 à 3,5 g.L puis elle est de 252 Pa.s à 4 g.L⁻¹.

La concentration critique de recouvrement est plus forte que celle obtenue pour l'exopolysaccharide produit par la microalgue rouge *P. cruentum* qui est de 0,6 g.L⁻¹ (Patel *et al.*, 2013). Cela peut en partie s'expliquer par la taille du polymère. En effet le polymère de *Porphyridium cruentum* ($2,39 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹) à une taille deux fois supérieure comparé à celui de *Rhodella* (Patel *et al.*, 2013).

4.3. Conclusion intermédiaire

L'exopolymère de *Rhodella violacea* est assimilable à un glycane de type xylane sulfaté de haute masse molaire (jusqu'à $1,2 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹). Une quantité significative de protéines a été

Résultats et discussion

détectée, néanmoins d'autres analyses seraient nécessaires afin vérifier la présence (ou l'absence) de liaison covalente entre cette partie protéique et la partie polysaccharidique. La composition en monosaccharides, sulfate et protéines semble peu modifiée avec les conditions de culture testées. L'EPS de *Rhodella violacea* LMGEIP 001 est un polymère complexe qui contient 50% d'oses dont 50 à 75% de xylose. Le xylose est le plus important des monosaccharides comme pour les EPS d'autres espèces de microalgues rouges telle que l'espèce *Porphyridium*. Cependant contrairement aux autres microalgues rouges il ne contient pas de mannose. L'exopolymère de *Rhodella violacea* contient 4 populations différentes, dont la plus importante en taille a une masse molaire de $1,2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$.

5. Activités antiparasitaires des polysaccharides de micro- et macroalgues contre les microsporidies

Comme de nombreux autres polysaccharides et notamment les polysaccharides sulfatés, les exopolymères produits par les microalgues rouges peuvent présenter des activités biologiques. Différents polymères, produits par des micro- ou des macroalgues ont été testés pour leurs activités antiparasitaires contre deux modèles de microsporidies : les microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* qui infectent les mammifères (lapin, homme...) et les microsporidies *Nosema ceranae* responsables de la Nosémose des abeilles.

Les microsporidies sont des microorganismes unicellulaires, parasites intracellulaires obligatoires, du règne des champignons. Les microsporidies infectent les cellules hôte via le système de communication cellulaire en se fixant sur les glycosaminoglycanes de surface (Hayman *et al.*, 2005). Les glycosaminoglycanes sont des hétéropolysaccharides complexes et sulfatés et certains exopolysaccharides de microalgues peuvent présenter des activités de type mimétique des GAGs. Ils peuvent par conséquent entrer en compétition avec les sites d'adhésion du parasite au niveau de la cellule hôte.

Les tests de l'effet antiparasitaire de polysaccharides sur des microsporidies ont été réalisés *in vivo* et *in vitro* sur le modèle HFF et l'abeille.

Tous les polysaccharides ont été testés *in vitro* sur les microsporidies *E. cuniculi*. L'objectif de cette première sélection était d'identifier les meilleurs candidats susceptibles de réduire les charges parasitaires et les concentrations d'utilisation des polymères permettant d'éviter toute toxicité. La mise en place de tests antiparasitaires *in vivo* avec le modèle abeille nécessite en effet beaucoup d'insectes et ne peut être appliqué qu'à un nombre limité de polysaccharides.

Résultats et discussion

Trois carraghénanes commerciaux de type Iota (C1, C2 et C3) et 11 polymères extraits au laboratoire à partir de micro- et de macroalgues ont été testés aux concentrations 10, 50, 100 et 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.1. Etude de l'activité antiparasitaire *in vitro* sur des cellules fibroblastiques de prépuce humain (HFF) (microsporidies *Encephalitozoon cuniculi*)

Les activités antiparasitaires des polysaccharides sont testées en pré-incubation. Les cellules HFF sont cultivées jusqu'à confluence puis exposées pendant deux heures aux polysaccharides testés. Les microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* sont également mises en contact avec les extraits de polysaccharides pendant deux heures avant d'être mises en présence des cellules HFF. Dans un premier temps l'évolution du nombre de microsporidies au sein des cultures de cellules est suivie avec tous les polymères testés. Les résultats obtenus sont synthétisés dans la Figure 79.

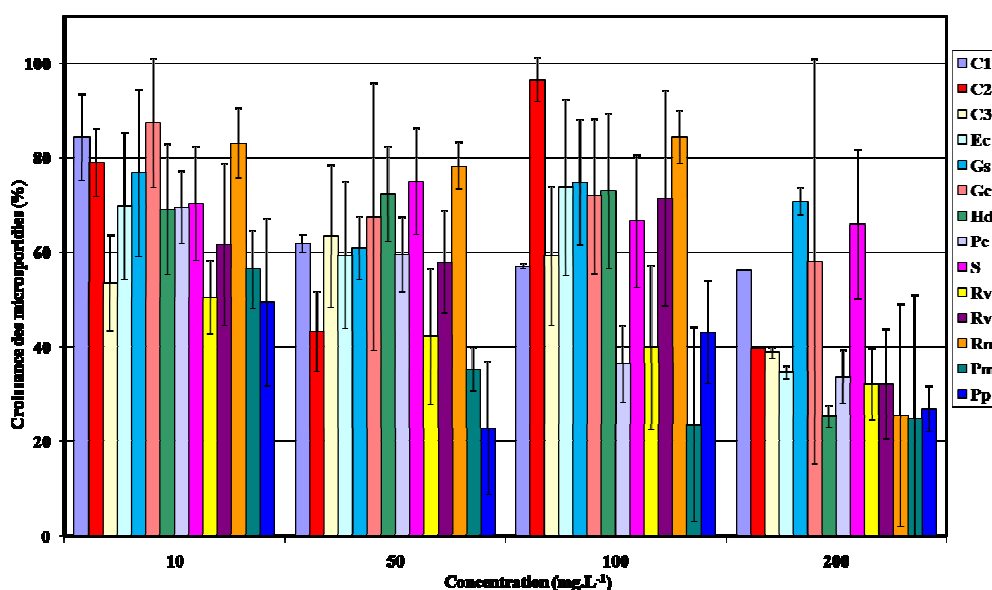


Figure 79 Multiplication des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* dans les cellules HFF en présence d'extraits polysaccharidiques à différentes concentrations.

Le 100% de croissance correspond au témoin infecté sans traitement. C1 à C3, carraghénanes ; Ec, *Euchema cottonii* ; Gs, *Gracilaria sp.* ; Gc, *Gracilaria canaliculata* ; Hd, *Halymenia durvillei* ; S, *Arthrospira platensis* ; Pc, *Porphyridium cruentum* ; Rv, *Rhodella violacea* LMGEIP 001 ; Rv', *Rhodella violacea* CCAP 1388/5 ; Rm, *Rhodella maculata* ; Pm, *Porphyridium marinum* ; Pp, *Porphyridium purpureum*.

Résultats et discussion

Les EPS de macroalgues *Gracilaria* et *Eucheuma* n'ont pas d'effet antiparasitaire sur les microsporidies *E. cuniculi*. Les EPS des microalgues rouges, *Porphyridium* et *Rhodella* ont une activité antiparasitaire importante quel que soit l'espèce, permettant de diminuer la croissance des microsporidies jusqu'à 80% pour des concentrations comprises entre 100 et 200 mg.L⁻¹. Les extraits issus des souches *Rhodella violacea* LMGEIP 001 et de *Rhodella violacea* CCAP 1388/5 ont des activités équivalentes. En fin d'expérience, la cytotoxicité des polymères a été évaluée pour chacune des concentrations testées par dosage des protéines après coloration à la sulforhodamine b. Seuls les exopolymères des microalgues du genre *Porphyridium* et *Rhodella violacea* ont montré un effet toxique sur les cellules HFF à 200 mg.L⁻¹ et présentent donc leur optimum d'effet antiparasitaire sans toxicité à 100 mg.L⁻¹. D'autres expériences ont été conduites sur l'activité antiparasitaire *in vitro* des molécules les plus réactives (C1, C2, C3, S, Hd, Rv, Rv', Pp, U, Rm, Pm) afin de tester la reproductibilité des résultats aux concentrations de 200 mg.L⁻¹ pour les polysaccharides sauf celui de *Porphyridium marinum* (Pm) et *Rhodella violacea* (Rv, Rv') qui ont été testés à des concentrations de 100 mg.L⁻¹ (Figure 80).

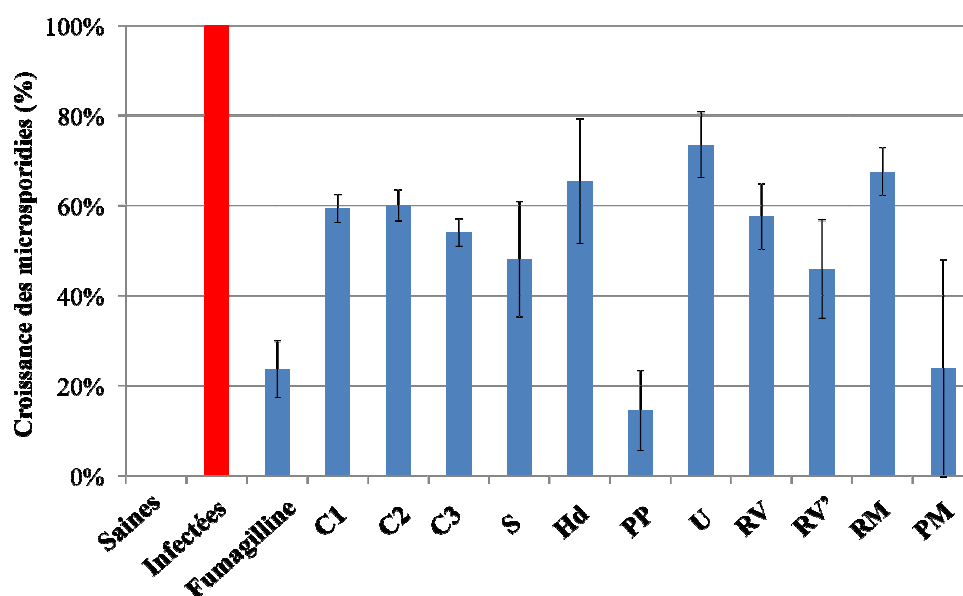


Figure 80 Multiplication des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* dans les cellules HFF en présence d'extrait polysaccharidique.

Le 100% de croissance correspond au témoin sans traitement. C1, C2 et C3, carraghénanes ; Hd, *Halymenia durvillei* ; S, *Arthrospira platensis* ; Pp, *Porphyridium purpureum* ; Rm, *Rhodella maculata* ; à des concentrations de 200 mg.L⁻¹.

Pm, *Porphyridium marinum* ; Rv, *Rhodella violacea* LMGEIP 001 ; Rv', *Rhodella violacea* CCAP 1388/5 ; à des concentrations de 100 mg.L⁻¹.

Résultats et discussion

L'aspect des cellules HFF a été observé au microscope ($\times 40\,000$) afin de vérifier leur intégrité. Les cellules n'apparaissent pas altérées suite aux traitements avec les EPS de microalgues rouges. Cependant, la présence de foyers de microsporidies a pu être détectée. Il est donc possible d'envisager que les extraits de microalgues ont un effet non létal sur les microsporidies et se contenteraient d'empêcher leur interaction avec les cellules HFF, limitant l'infection. Ainsi, les biopolymères testés interfèreraient avec la communication entre les cellules hôtes et les parasites en mimant probablement les motifs glycosaminoglycanes présents sur la surface de la cellule hôte (Hayman *et al.*, 2005). Le polymère des *Rhodella violacea* et celui des souches appartenant au genre *Porphyridium* interviendraient donc principalement comme des traitements préventifs de l'infection de cellules eucaryotes par des microsporidies.

Les polymères les plus efficaces *in vitro* (les EPS de *Porphyridium purpureum* et *marinum*, *Rhodella violacea* LMGEIP 001, et CCAP 1388/5, *Halymenia durvillei*, *Arthrospira platensis* et les carraghénanes C1 et C3) ont été testés *in vivo* sur le modèle abeille.

5.2. Etude de l'activité antiparasitaire *in vivo* sur le modèle abeille (microsporidie *Nosema ceranae*)

Afin de tester les activités antiparasitaires des polysaccharides sélectionnés, des abeilles naissantes sont récoltées puis isolées dans des cagettes. Le mode opératoire implique l'utilisation de 45 abeilles par cagette avec trois cagettes par condition ainsi que trois conditions témoins (abeilles saines, abeilles infectées sans traitement, et abeilles infectées traitées avec la fumagilline). Il est donc nécessaire d'avoir au minimum $45 \times 3 \times 3 = 405$ abeilles pour les conditions témoins plus 135 abeilles par condition à tester.

Les extraits à tester ont été ajoutés à l'alimentation des abeilles dès la naissance en traitement préventif puis maintenus tout au long de l'expérience (concentrations de 200 mg.L^{-1} pour les polysaccharides, sauf Pm, Rv et Rv' qui ont été testés à 100 mg.L^{-1}). Lorsque les abeilles sont âgées de 5 jours elles sont infectées individuellement par les microsporidies.

L'EPS de *Rhodella violacea*, de *Porphyridium purpureum* et *marinum*, d'*Halymenia durvillei* et d'*Arthrospira platensis* ainsi que deux carraghénanes (C1 et C3) ont été testés. Les caractéristiques des polysaccharides testés sont résumées dans le Tableau 14.

Tableau 14 Caractéristiques des polymères testés

Organisme	Genre et espèce	Conditions de culture	Pureté (%)	Masse moléculaire (g/mol)	Oses neutres (%)	Oses acides (%)	Sulfates (%)	Protéines (%)	Composition en monosaccharides (ratios molaires %)	
Microalgue rouge	<i>Porphyridium marinum</i>	PBR	86,1 ± 3,6	1 800 000	67,9 ±0,3	19,6 ± 1,0	8,4 ±1,5	-	Galactose	47
									Xylose	30
									Glucose	20
									Ac glucuronique	2
									Fucose	1
Microalgue rouge	<i>Porphyridium purpureum</i>	PBR	88,0 ± 4,1	<i>n.d.</i>	70,8 ± 1,2	17,9 ± 0,8	9,1 ± 0,3	-	Galactose	42
									Xylose	30
									Glucose	25
									Ac glucuronique	2
									Fucose	1
Microalgue rouge	<i>Rhodella violacea L</i>	PBR	69,3 ± 4,1	1 200 000	55,0 ± 1,0	12,9 ± 0,5	4,3 ± 1,1	6,0 ± 0,3	Xylose	45
									Galactose	39
									Rhamnose	8
									Ac glucuronique	3
									Arabinose	3
									Glucose	1
Microalgue rouge	<i>Rhodella violacea C</i>	Fiole	52,8 ± 3,5	<i>n.d.</i>	42,4 ± 2,0	8,2 ± 1,4	2,7 ±0,1	5,5 ± 0,5	Galactose	52
									Xylose	34
									Glucose	7
									Ac glucuronique	3
									Rhamnose	2
									Arabinose	1
Microalgue rouge	<i>Rhodella maculata</i>	Fiole	58,7 ± 1,6	<i>n.d.</i>	49,8 ± 0,3	9,7 ± 2,2	9,1 ±0,1	6,4 ± 0,6	Galactose	45
									Xylose	42
									Ac glucuronique	5
									Rhamnose	5
									Arabinose	2
									Glucose	1

Tableau 12 (suite) Caractéristiques des polymères testés

Cyanobactérie	<i>Arthrospira platensis</i>	Fiole	37,6 ± 1,2	n.d.	22,6 ± 0,9	14,9 ± 0,8	1,7 ± 0,4	n.d.	Glucose	24
									Rhamnose	22
									Xylose	15
									Fucose	14
									Ac glucuronique	13
									Galactose	12
Macroalgue rouge	<i>Halymenia durvillei</i>	/	75,9 ± 2,1	1 500 000	75,6 ± 0,1	0,6 ± 0,3	33,8 ± 0,1	-	Galactose	89
									Arabinose	5
									Glucose	3
									Fucose	2
									Xylose	1
Macroalgue rouge	<i>Iota carrageenan C1</i>	/	73,5 ± 2,1	820 000	70,4 ± 0,5	1,9 ± 0,9	28,2 ± 4	n.d.	Galactose	95
									Fucose	3
									Glucose	1
									Xylose	1
Macroalgue rouge	<i>Iota carrageenan C3</i>	/	83,1 ± 1,8	n.d.	72,9 ± 0,6	1,1 ± 0,9	17,9 ± 0,3	n.d.	Galactose	56
									Glucose	41
									Fucose	2
									Xylose	1
Macroalgue verte	<i>Ulva lactuca</i>	/	67,3 ± 3,2	~1 500 000	50,6 ± 0,5	17,6 ± 0,3	15,1 ± 0,3	7,1 ± 0,7	Rhamnose	52
									Glucose	30
									Ac glucuronique	9
									Xylose	5
									Galactose	3

Résultats et discussion

Dans une première expérimentation, la consommation de saccharose par abeille (Figure 81), et la mortalité des abeilles ont été suivies (Figure 82) pour les traitements avec l'EPS de *Rhodella violacea*, d'*Arthrospira platensis*, et les deux carraghénanes (C1 et C3).

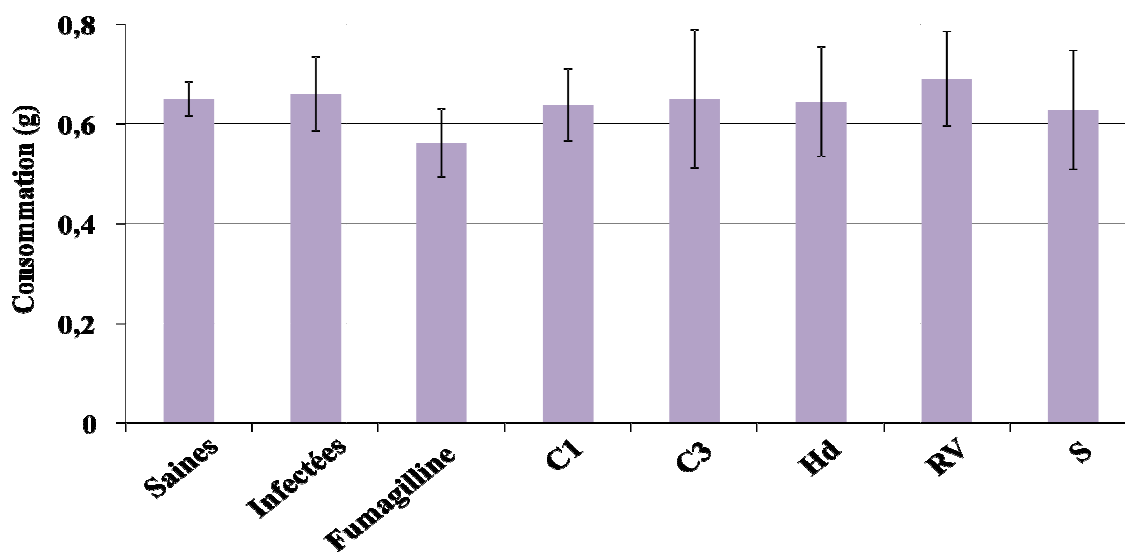


Figure 81 Consommation de saccharose par les abeilles infectées par les microsporidies *Nosema ceranae*. C1 et C3, carraghénanes ; Hd, *Halymenia durvillei* ; S, *Arthrospira platensis* ; Rv, *Rhodella violacea* LMGEIP 001.

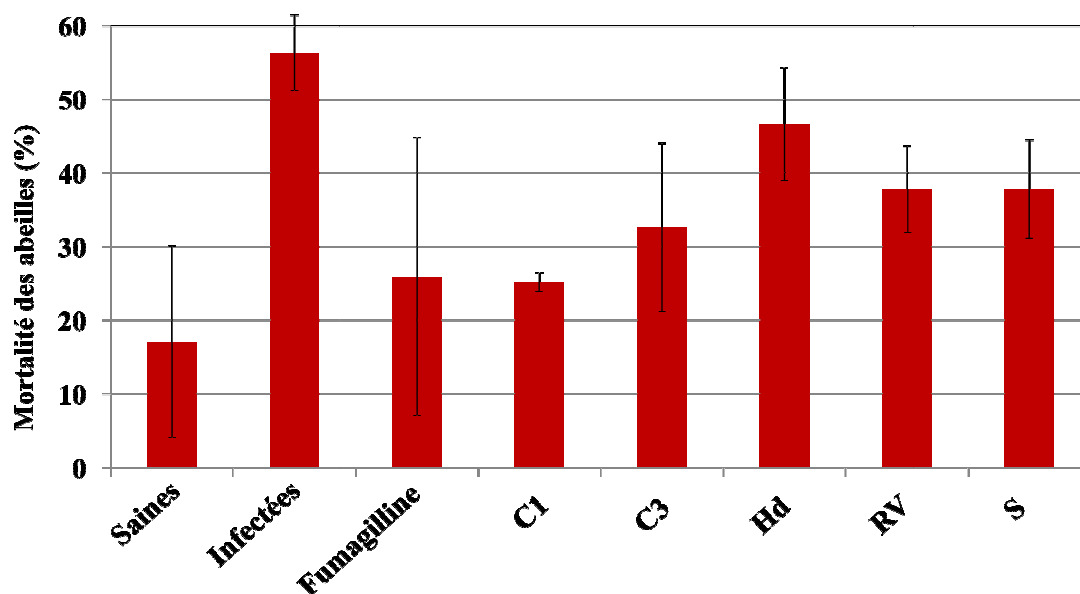


Figure 82 Mortalité des abeilles infectées par les microsporidies *Nosema ceranae*. C1 et C3, carraghénanes ; Hd, *Halymenia durvillei* ; S, *Arthrospira platensis* ; Rv, *Rhodella violacea* LMGEIP 001.

Résultats et discussion

Le suivi de la consommation de saccharose permet de vérifier que les polymères additionnés à l'alimentation des abeilles ne changent pas l'appétence du saccharose. De plus, cela permet d'observer les effets de l'infection sur l'alimentation des abeilles puisque les abeilles infectées ont une tendance à augmenter leur métabolisme énergétique ce qui se traduit par une surconsommation de saccharose (Mayack et Naug, 2009). Lors de cette étude, la consommation cumulée de saccharose par abeille (consommation totale) est équivalente pour toutes les conditions testées. Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet du stress induit par l'isolement des abeilles en cagettes qui introduit un biais (les abeilles saines sont stressées et augmentent leur consommation de façon équivalente à celle des abeilles infectées).

Dans une seconde expérimentation la charge infectieuse en parasites et la mortalité des abeilles sont suivis pour les traitements avec l'EPS de *Rhodella violacea*, de *Porphyridium purpureum* et *marinum*, pour deux carraghénanes et pour le mélange C1- *P. purpureum* afin d'identifier d'éventuelles synergies.

La mortalité des abeilles infectées sans traitement est comprise entre 53-56% 15 à 16 jours après infection (Figure 83) contrairement aux travaux de Higes *et al.*, (2007) qui obtiennent une mortalité de 94% après 7 jours d'infection. Cette différence peut s'expliquer par la virulence des spores. La variation de réponse aux parasites des abeilles est en effet multifactorielle. Il existe des facteurs environnementaux auxquels sont soumises les ruches et des facteurs génétiques. La réaction antiparasitaire individuelle dépend de l'espèce, puisqu'il existe une variabilité génétique dans la réaction à l'infection (Fontbonne *et al.*, 2013). En effet, les abeilles *Apis mellifera* possèdent différents écotypes (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*). De plus la qualité génétique des abeilles est difficile à maintenir, notamment lorsque la reine se reproduit avec différents bourdons. Ces différences expliquent aussi les variations intra ruche qui engendrent de grands écarts type dans la mortalité et la charge infectieuse en parasites des abeilles (Figure 83). De plus Higes *et al.* (2007) ont testé les effets de la Nosémosse sur 20 abeilles contre 45 dans cette étude.

Résultats et discussion

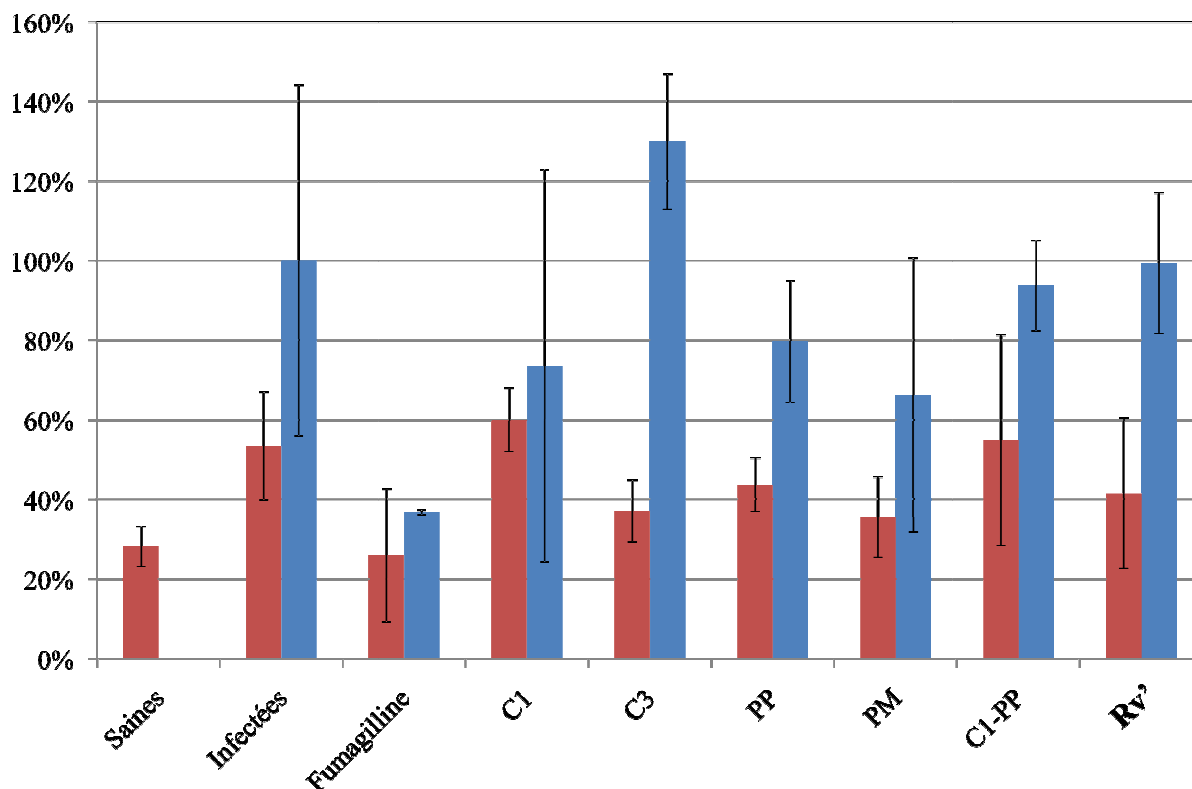


Figure 83 Mortalité (rouge) et charge parasitaire (bleu) des abeilles infectées par les microsporidies *Nosema ceranae*. C1 et C3, carraghénanes ; Rv', *Rhodella violacea* CCAP 1388/5 ; Pm, *Porphyridium marinum* ; Pp, *Porphyridium purpureum* ; C1-PP, mélange de polysaccharide C1 et Pp (concentrations respectives 200 mg.L⁻¹ et 100 mg.L⁻¹).

L'exopolysaccharide de *Rhodella violacea* permet de diminuer significativement la mortalité des abeilles (Figure 82 et Figure 83). Cependant, le carraghénane C1 et les exopolysaccharides de *P. purpureum* et *P. marinum* ont un effet plus important sur la croissance des microsporidies, plus proche de l'effet induit par la fumagilline. Le nombre de spores par abeille est peu différent avec ou sans traitement par l'EPS de *Rhodella violacea*, cependant il permet de diminuer la virulence des microsporidies puisque la mortalité des abeilles est diminuée de 20% par rapport aux abeilles infectées n'ayant pas reçu de traitement. Le mélange des deux molécules C1 et l'EPS de *P. purpureum*, ayant un effet antiparasitaire important, ne permet pas d'augmenter l'efficacité des molécules.

La pureté des exopolysaccharides doit jouer un rôle dans l'activité biologique des polymères les plus actifs contre la nosébose. En effet, les EPS de *Porphyridium* (*marinum* et *purpureum*) ainsi que le carraghénane C3, qui sont les plus actifs, ont la plus grande pureté (entre 83 et 88%). D'autre part, la quantité de sulfate présent dans les polymères joue peut

Résultats et discussion

être un rôle. C3 à une action plus importante que C1, et C3 contient 18 % de sulfate alors que C1 en contient 28%. De plus, ces trois polymères contiennent du fucose dans leur structure qui pourrait jouer un rôle important. En effet, le fucose entre dans la composition de certains motifs Glycosaminoglycanes tels que le GAG du concombre de mer (Kariya *et al.*, 1997 ; Wu *et al.*, 2010). De plus, des molécules mimétiques des GAGs ont également une structure proche de l'EPS de *P. marinum* et *purpureum*, et de C3. Par exemple le polysaccharide sulfaté (15%) produit par le mollusque *Haliotis discus hannai* contient du galactose, du glucose, du fucose, et il possède une activité anticoagulante *in vitro*, il prolonge l'action des trombines et diminue le temps de coagulation du plasma sanguin (Li *et al.*, 2011).

5.3. Conclusion intermédiaire

Les EPS de microalgues rouges ont un effet antiparasitaire. Les polymères de *Rhodella* et *Porphyridium* permettent de diminuer l'infection par des microsporidies *in vivo* et *in vitro* en interférant avec la communication cellulaire hôte-parasite. Les molécules n'ont pas d'effets létaux sur les parasites, cependant elles permettent de réduire l'infection cellulaire, et le nombre de spores par abeilles ou cellules. Cela induit une augmentation du taux de survie chez les abeilles. Dans ce cas, en traitement préventif, les molécules actives pourraient diminuer la prolifération des parasites chez l'abeille ainsi que sa prolifération par transmission au sein d'un essaim. Les EPS de microalgues rouges se présentent donc comme un possible traitement préventif contre la Nosémosse des abeilles.

Conclusion

Le but de ce travail de thèse était la production d'exopolymères par la microalgue *Rhodella violacea* afin de les caractériser d'un point de vue structural et d'identifier leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (en collaboration avec le Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement de l'Université Blaise Pascal).

Les microalgues du genre *Rhodella* sont des microalgues rouges productrices d'exopolymères constituées d'une seule espèce : *Rhodella violacea*. La microalgue utilisée dans cette étude est nommée *Rhodella violacea* LMGEIP 001. Elle a été identifiée après séquençage partiel du gène codant pour son ARNr 18S, déposé dans la base de données NCBI avec le numéro d'accès KC515354.

Dans un premier temps, l'étude de la photosynthèse et des conditions de culture de *Rhodella violacea* LMGEIP 001 a permis de déterminer les paramètres physico-chimiques optimaux pour la croissance et la production d'exopolysaccharides. Les microalgues *R. violacea* LMGEIP 001 ne sont cultivables ni en hétérotrophie ni en mixotrophie du fait de la présence de bactéries dans la culture qui est non axénique. La présence de glucose dans le milieu favorise donc la croissance bactérienne au détriment du développement de la microalgue. La culture a donc été menée en autotrophie. A l'avenir, seule l'utilisation de cultures axéniques de *Rhodella violacea* permettra d'envisager des cultures en hétérotrophie. Le milieu f/2 a été sélectionné pour la culture de *Rhodella* puis sa composition a été adaptée après son étude stœchiométrique afin de produire 1 g.L⁻¹ de biomasse. Le milieu f/2 a ainsi été supplémenté en azote (+ 0,523 g.L⁻¹ de nitrate de sodium) et en phosphore (+ 0,0288 g.L⁻¹ de dihydrogénophosphate de sodium). La culture optimale de la microalgue *Rhodella violacea* est possible pour une irradiance de 420 μmol de photons.m⁻².s⁻¹, avec une température de 24°C et un pH de 8,3. Ces conditions permettent la production de 0,5 g.L⁻¹ d'exopolymère et de 1,13.10⁷ cellules.mL⁻¹ dans un photobioréacteur cylindrique de 5 L.

L'extrait issu du surnageant de la culture de la microalgue *R. violacea* LMGEIP 001 a été analysé. Les dosages colorimétriques ont été utilisés pour déterminer la quantité d'oses et la part d'oses neutres et d'oses acides. Les quantités de protéines et de sulfates ont également été quantifiées. La composition en monosaccharides a été déterminée en utilisant la chromatographie ionique haute performance et la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les propriétés physiques de l'EPS ont été établies avec une étude de

Conclusion

comportement rhéologique ainsi que par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-angles. L'analyse du polymère obtenu dans les différentes conditions de culture a mis en évidence la production d'un hétéropolysaccharide complexe dont la composition reste stable pour les différentes conditions testées. L'EPS de *R. violacea* est un protéoxylane sulfaté de haute masse molaire : $1,3 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$. Il contient 47 à 54% d'oses dont 70 à 80% d'oses neutres mais également 3 à 5% de sulfates et entre 4 et 6% de protéines. Le xylose est le monosaccharide majoritaire, mais du rhamnose, du glucose, du galactose, de l'arabinose et de l'acide glucuronique ont également pu être identifiés. De plus l'EPS à une viscosité importante à faible concentration et présente un comportement rhéofluidifiant.

Les propriétés physiques et rhéologiques de l'EPS de *R. violacea* suggèrent une possible utilisation du polymère comme gélifiant épaississant, notamment pour l'alimentation humaine. La caractérisation structurale du polymère produit par *R. violacea* doit être élucidée d'avantage. En effet la détermination des liaisons osidiques et des formes alpha et bêta auxquelles appartiennent les monosaccharides restent à définir, ainsi qu'une analyse plus approfondie du comportement rhéologique du polymère.

Les activités antiparasitaires de 14 molécules polysaccharidiques ont été testées *in vitro* sur les cellules HFF et *in vivo* sur le modèle abeille. Les molécules testées sont des polysaccharides issus de macro et microalgues. Toutes les molécules ont été testées *in vitro* et seules les plus efficaces ont été utilisées sur les abeilles. Le polymère d'*Halymenia durvillei*, les carraghénanes et l'EPS de *R. violacea* ont une action antiparasitaire sur les microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Nosema ceranae*. L'EPS issu des deux souches de *Rhodella violacea* (LMGEIP 001 et CCAP 1388/5) ont une action antiparasitaire équivalente sur les microsporidies. L'EPS de *Rhodella violacea* ralentit le développement des microsporidies *in vitro* (*E. cuniculi* sur les HFF) et *in vivo* (*N. ceranae* sur le modèle abeille) de respectivement 55% et 60%. Cependant l'action la plus efficace contre les parasites est obtenue avec d'autres extraits de polysaccharides. Les EPS de *Porphyridium purpureum* et *Porphyridium marinum* ont les activités antiparasitaires les plus importantes. Ces molécules empêchent la multiplication des microsporidies qui diminuent *in vitro* de 85% et de 75% pour respectivement les exopolymères de *P. purpureum* et *P. marinum*. La mortalité des abeilles infectées par les *N. ceranae* et traitées avec l'EPS de *Porphyridium purpureum* et *marinum* sont diminuées de 10% et 15%. D'après les résultats obtenus, les polymères auraient une action antiparasitaire en traitement préventif. Les polysaccharides se comporteraient comme

Conclusion

des mimétiques des glycosaminoglycanes présents sur la surface des cellules hôtes qui interfèreraient avec la communication entre la cellule hôte et le parasite en empêchant la fixation des microsporidies.

Les activités antiparasitaires ont été déterminées sur le modèle abeille, avec des abeilles maintenues en cagettes, ce qui introduit un biais. Afin de valider l'action des différentes molécules, l'activité antiparasitaire doit être testée sur une ruche entière dans un prototype plus proche de la réalité. Par conséquent des expérimentations en tunnel sur des ruches maintenues en extérieur avec des abeilles en semi-liberté devront être réalisées. D'autre part, des tests d'activité biologique doivent être réalisés sur des polysaccharides modifiés (désulfatés ou sursulfatés) et des oligosaccharides issus de ces mêmes polysaccharides afin de pouvoir mettre en évidence des relations structure/fonction.

Références

- A.P.H.A.** 1971. Ultraviolets spectrometric method in standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*, Washington D.C. 237-239.
- Adams** Y., Smith S.L., Schwartz-Albiez R., Andrews K.T. 2005. Carrageenans inhibit the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and cytoadhesion to CD36. *Parasitology Research*. 97: 290-294.
- Akimoto** S., Yokono M., Hamada F., Teshigahara A., Aikawa S., Kondo A. 2012. Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1817(8) : 1483-1489.
- Allen** M.M., Stanier R.Y. 1968. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *Journal of General Microbiology*. 5 1: 203-209
- Andersen** R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier/Academic Press. 1-578.
- Arad** Malis S., Levy-Ontman O. 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Current Opinion in Biotechnology*. 21 (3) : 358-364.
- Athanasiadis** A. 1996. Taxonomisk litteratur och biogeografi av Skandinaviska rödalger och brunalger. *Göteborg: Algologia*. 1-280.
- Bafana** A. 2013. Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate Polymers*. 95(2) : 746-752.
- Becker** E.W. 1994. Chemical composition, *In* : Microalgae : Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press (Eds.). 177-195.
- Becker** E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25 : 207-210.
- BeMiller** J.N. 1967. Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 22 : 47-53.
- Bertrand** D., Dufour E. 2000. La spectroscopie infra-rouge et ses applications analytiques. Technique & Documentation, Paris, Lavoisier (Eds.). 1-566.

Références

- Bigliardi** E., Sacchi L. 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection*. 3 : 373-379.
- Billard** C., Fresnel J. 1986. *Rhodella cyanea* nov. sp., une nouvelle Rhodophyceae unicellulaire. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie*. 302 : 271-276.
- Blumenkrantz** N., Asbee-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. 54 : 484-489.
- Boulet** J.C., Williams P., Doco T. 2007. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 69 (1) : 79-85.
- Bourgeois** A.L., Rinderer T.E., Beaman L.D., Danka R.G. 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103 : 53-58.
- Bradford** M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72 : 248-254.
- Brilman** W., Garcia Alba L., Veneman R. 2013. Capturing atmospheric CO₂ using supported amine sorbents for microalgae cultivation. *Biomass and Bioenergy*. 53 : 39-47.
- Brown** M.R., Jeffrey S.W., Volkman J.K., Dunstan G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151 : 315-331.
- Cadoret** J.P., Bernard O. 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Le journal de la Société de Biologie*. 202(3) : 201-211.
- Capek** P., Matulová M., Combourieu B. 2008. The extracellular proteoglycan produced by *Rhodella grisea*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43 : 390-393.
- Carpita** N.C., Shea E.M. 1989. Linkage structure by gas chromatography-mass spectrometry of partially-methylated alditol acetates. In : Analysis of Carbohydrates by GLC and MS (C.J. Biermann, G.D. McGinnis). CRC Press, Boca Raton, FL (Eds.). 155-216.
- Cavalier-Smith** T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*. 73(3) : 203-266.

Références

- Cawse** P.A. 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrometry. *Analyst*. 62 : 311-315.
- Chaimanee** V., Chantawannakul P., Chen Y., Evans J.D., Pettis J.S. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*. 58 : 1090-1095.
- Chambers** R.E., Clamp J.R. 1971. An assessement of methanolysis and other factor used in analysis of carbohydrate cantaining material. *Biochemical Journal*. 125 : 1009-1018.
- Chen** F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*. 14 : 412-426.
- Chen** Y., Evans J.D., Zhou L., Boncristiani H., Kimura K., Xiao T., Litkowski A.M., Pettis J.S. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101 : 204-209.
- Ciucanu** I. Kerek F. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 131 : 209-217.
- Cogne** G., Lehmann B., Dussap CG., Gros JB. 2003. Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: culture medium optimization. *Biotechnology and Bioengineering*. 81 : 588–593.
- Converti** A., Casazza A.A., Ortiz E.Y, Perego P., Del Borghi M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 48(6) : 1146-1151.
- Cowan** A.K., Logie M.R.R., Rose P.D., Phillips L.G. 1995. Stress Induction of Zeaxanthin Formation in the β -Carotene Accumulating Alga *Dunaliella salina* Teod. *Journal of Plant Physiology*. 146(4) : 554-562.
- Croft** M.T., Lawrence A.D., Raux-Deery E., Warren M.J., Smith A.G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature (Letters)*. 438(3) : 90-93.
- Cross** M.M. 1965. Rheology of non-Newtonian fluids: a new flow equation for pseudoplastic systems. *Journal of Colloid Science*. 20 : 417-423.

Références

- Cuaresma** M., Garbayo I., Vega J.M., Vilchez S. 2006. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*. 40 : 158-162.
- Da Silva** A.F., Lourenço S.O., Chaloub R.M. 2009. Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Aquatic Botany*. 91(4) : 291-297.
- De Jesus Raposo** M.F., de Moraes R.M., Bernardo de Moraes A.M. 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*. 11(1) : 233-252.
- De Reviers** B. 2003. Biologie et phylogénie des algues. Belin (Eds). Tome 1 : 1-352 et 2 : 1-256.
- Deason** T.R., Butler G.L., Rhyne C. 1983. *Rhodella reticulata* sp. nov., a new coccoid rhodophytan alga (Porphyridiales). *Journal of Phycology*. 19 : 104-111.
- De-Bashan** L.E., Trejo A., Huss V.A.R., Hernandez J-P., Bashan Y. 2008. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*. 99(11) : 4980-4989.
- Degrenne** B., Pruvost J., Christophe G., Cornet J.F., Cogne G., Legrand J. 2010. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35 : 10741-10749.
- DeJongh** D.C. 1964. Mass spectrometry in carbohydrate chemistry. Acyclic peracetates of pentoses and hexoses. *Journal of Organic Chemistry*. 30 : 453-458.
- DeJongh** D.C., Radford T., Hribar J.D, Hanessian S., Bieber M. Dawson G., Sweeley C.C. 1968. Analysis of trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*. 91 (7) : 1728-1740.
- Desportes-Livage** I., Datry A. 2005. Infections à microsporidies, *Isospora* et *Sarcocystis*. Microsporidia, *Isospora* and *Sarcocystis* infections. *EMC - Maladies Infectieuses*. 2(4) : 178-196.
- Deverrière** M. 2003. Thèse : Microsporidies communes a l'homme et aux animaux : étude bibliographique. Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse. 1-71.

Références

- Dillon J.C.**, Phan P.A. 1993. Spirulina as a source of proteins in human nutrition. *In*: Spiruline algue de vie. Doumengue F, Durand-Chastel H, Toulemont A (Eds). Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco. 12 :103-107.
- Dizerbo A.H.**, Herpe E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Normandes incluses. Landernau, Anaximandre (Eds). 1-315.
- Dodgson K.S.**, Price R.G. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*. 84 : 106-110.
- Drew K.M.**, Ross R. 1965. Some generic names in the Bangiophycidae. *Taxon*. 14 : 93-99.
- Dubois M.**, Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28 (3) : 350-356.
- Dubreucq G.** 1996. Thèse : Contribution à l'étude structurale d'un polysaccharide excrété par la bactérie *Alteromonas sp.* 1644 isolée du milieu hydrothermal profond. Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Dussaubat C.**, Maisonnasse A., Crauser D., Beslay D., Costagliola G., Soubeyrand S., Kretzchmar A., Le Conte Y. 2013. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*. 113 : 42-51.
- Eggert A.**, Nitschke U., West J.A., Michalik D., Karsten U. 2007. Acclimation of the intertidal red alga *Bangiopsis subsimplex* (Stylonematophyceae) to salinity changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 343 : 176-186.
- Eilers P.H.C.**, Peeters J.C.H. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*. 42 : 199-215.
- Eteshola E.**, Karpasas M., Arad S., Gottlieb M. 1998. Red microalga exopolysaccharides : 2. Study of the rheology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations. *Acta Polymerica*. 49(10-11) : 549-556.
- Evans L.V.** 1970. Electron microscopical observations on a new red algal unicell, *Rhodella maculata* gen. nov., sp. nov. *British Phycological Journal*. 5 : 1-13.
- Evans L.V.**, Maureen E. 1974. Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. *Journal of Cell Science*. 16 : 1-21.

Références

- Fabregas J.**, García D., Fernandez-Alonso M., Rocha A.I., Gómez-Puertas P., Escribano J.M., Otero A., Coll J.M. 1999. *In vitro* inhibition of the replication of *haemorrhagic septicaemia* virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral Research*. 44(1) : 67-73.
- Falshaw A.**, Furneaux A.H. 1998. Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae, *Gigartinalanceata* and *Gigartinachapmanii* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*. 307: 325-331.
- Fawley, M.W.**, Fawley K.P. 2004. A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *Journal of Phycology*. 40 : 223-225.
- Fenoradosoa T.A.**, Delattre C., Laroche C., Wadouachi A., Dulong V., Picton L., Andriamadio P., Michaud P. 2009. Highly sulphated galactan from *Halymenia durvillei* (Halymeniales, Rhodophyta), a red seaweed of Madagascar marine coasts. *International Journal of Biological Macromolecules*. 45 : 140–145.
- Fontbonne R.**, Garnery L., Vidau C., Aufauvre J., Texier C., Tchamitchian S., El Alaoui H., Brunet J.L., Delbac F., Biron D.G. 2013. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 17 : 188-194.
- Fresnel J.**, Billard C., Hindák, F., Pekárková B. 1989. New observations on *Porphyridium griseum* Geitler = *Rhodella grisea* (Geitler) comb. nova (Porphyridiales, Rhodophyceae). *Plant Systematics and Evolution*. 164 : 253-262.
- Fukusumi T.**, Matsuda K., Mizoguchi T., Miyatake T., Ito S., Ikeda T., Tamiaki H., Oba T. 2012. Non-enzymatic conversion of chlorophyll-a into chlorophyll-d in vitro: A model oxidation pathway for chlorophyll-d biosynthesis. *FEBS Letters*. 586(16) : 2338-2341.
- Garon-Lardière S.** 2004. Thèse : Etude structural des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata*. Université de Bretagne Occidentale. 1-322.
- Geresh S.**, Arad S., Levy-Ontman O., Zhang W., Tekoah Y., Glaser R. 2009. Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium sp.* *Carbohydrate Research*. 344(3) : 343-9.

Références

- Geresh S.**, Mamontov A., Weinstein J. 2002. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 50 : 179-187.
- Gloaguen V.**, Ruiz G., Morvan H., Mouradi-Givernaud A., Maes E., Krausz P., Strecker G. 2004. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium sp.*: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydrate Research*. 339 : 97-103.
- Gómez-Ordóñez E.**, Rupérez P. 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*. 25(6) : 1514-1520.
- Goyal A.** 2007. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part II: Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45(9) : 705-710.
- Guaratini T.**, Cardozo K.H.M., Pinto E., Colepicolo P. 2009. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 20 : 1609-1616.
- Guihéneuf F.**, Mimouni Vi., Ulmann L., Tremblin G. 2009. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 369(2) : 136-143.
- Guillard R.R.L.**, Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*. 8 : 229-239.
- Guiry M.D.** 1997. Benthic red, brown and green algae. In: The Species Directory of the Marine Fauna and Flora of the British Isles and Surrounding Seas. Belfast & Ross-on-Wye: Ulster Museum & Marine Conservation Society. Howson, C.M. & Picton, B.E. (Eds). 341-367.
- Gupta V.**, Ratha S.K., Sood A., Chaudhary V., Prasanna R. 2013. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) - Prospects and challenges. *Algal Research*. 2(2) : 79-97.
- Han F.**, Wang W., Li Y., Shen G., Wan M., Wang J. 2013. Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light–dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. *Bioresource Technology*. 132 : 182-189.

Références

- Hardy** F.G., Guiry M.D. 2003. A check-list and atlas of the seaweeds of Britain and Ireland. *London : British Phycological Society*. 1-435.
- Harris** P.J., Henry R.J., Blackeney A.B., Stone B.A. 1984. An improved method for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 127 : 59-73.
- Harun** R., Singh M., Forde G.M., Danquah M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14 : 1037-1047.
- Hayman** J.R., Southern T.R., Nash T.E. 2005. Role of Sulfated Glycans in Adherence of the Microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to Host Cells In Vitro. *Infection and immunity*. 73 : 841-848.
- He** P.J., Mao B., Lü F., Shao L.M., Lee D.J., Chang J.S. 2013. The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*. 146 : 562-568.
- Heinze** T., Liebert T. 2001. Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science*. 26(9) : 1689-1762.
- Hemerick** G. 1973. Culture methods and growth measurements. *Handbook of Phycological Methods*. Stein J.L. (Eds.). Cambridge University Press. 1-260.
- Hernandez** J.P., De-Bashan L.E., Bashan Y. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella spp.* co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*. 38 : 190-198.
- Higes** M., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R., Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*. 94 : 211-217.
- Ho** S.H., Chen C.Y., Chang J.S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*. 113 : 244-252.
- Hong** D.D., Mai D.T.N., Thom L.T., Ha N.C., Lam B.D Tam L.T., Anh H.T.L., Thu N.T.H. 2013. Biodiesel production from Vietnam heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 116(2) : 180-185.

Références

- Hu Z.**, Li Y., Sommerfeld M., Chen F., Hu Q. 2008. Enhanced protection against oxidative stress in an astaxanthinoverproduction *Haematococcus* mutant (Chlorophyceae). *European Journal of Phycology*. 43 : 365-376.
- Hua C.W.**, Chuang L.T., Yu P.C, Chen C.N.N. 2013. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food Chemysrty*. 138 : 2071-2078.
- Huang C.C.**, Hung J.J, Peng S.H, Chen C.N.N. 2012a. Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor : Influences of CO₂ and nitrogen sources on the accelerated growth. *Bioresource Technology*. 112 : 228-233.
- Huang Q.**, Yao L., Liu T., Yang J. 2012b. Simulation of the light evolution in an annular photobioreactor for the cultivation of *Porphyridium cruentum*. *Chemical Engineering Science*. 84 : 718-726.
- Huheihel M.**, Ishanu V., Tal J., Arad Malis S. 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 50(2-3) : 189-200.
- Iwamoto K.**, Fukuyo S., Okuda M., Kobayashi M., Shiraiwa Y. 2012. Cryopreservation of the chlorophyll d-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Procedia Environmental Sciences*. 15 : 118-125.
- Jones R.F.**, Speer H.L., Kury W. 1963. Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Physiologia Plantarum*. 16 : 634-643.
- Kačuráková M.**, Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*. 43: 195-203.
- Kačuráková M.**, Wilson R.H. 2001. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*. 44 (4): 291-303.
- Kamerling J.P.**, Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R. 1975. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal*. 151: 491-495.
- Kamerling J.P.** 2007. Comprehensive glycoscience. From Chemistry to Systems Biology. Analysis of Glycans Polysaccharide Functional Properties. Elsevier Ltd (Eds). 2 : 1-814.

Références

- Kariya Y.**, Watabe S., Kyogashima M., Ishihara M., Ishii T. 1997. Structure of fucose branches in the glycosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Carbohydrate Research*. 297(3) : 273-279.
- Keeling P.J.**, Fast N.M. 2002. Microsporidia : Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*. 56 : 93-116.
- Klein B.C.**, Walter C., Lange H.A., Buchholz R. 2012. Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. *Journal of Applied Phycology*. 24(5) : 1133-1139.
- Koller K.P.**, Wehmeyer W., Mörschel E. 1978. Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. On the molecular composition of energy-transferring complexes (tripartite units) forming the periphery of the phycobilisomes. *European Journal of Biochemistry*. 91 : 57-63.
- Kornmann P.** 1965. *Porphyridium violaceum*, eine maine neue Art. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*. 12 : 420-423.
- Kornprobst J.M.** 2005. Substances naturelles d'origine marine. 2 volumes TEC & DOC/Lavoisier (Eds). 1-1800.
- Kozłowska-Szerenos B.**, Bialuk I., Maleszewski S. 2004. Enhancement of photosynthetic O₂ evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO₂ concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42(5) : 403-409.
- Kylin H.** 1937. Übereine marine *Porphyridium*-Art. *Kungl. Fysiografiska Sällskapet i Lund Förhandlingar*. 7 : 119-123.
- Lahaye M.**, Alvarez-Cabal E., Kuhlenkamp R., Quemener B., Lognon V., Dion P. 1999. Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 11: 1–7.
- Lam M.K.**, Lee K.T. 2011. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win-win strategies toward better environmental. *Protection. Biotechnology Advances*. 29 : 124-141.
- Lam M.K.**, Lee K.T. 2013. Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 14 : 169-176.

Références

- Lambert O.**, Veyrand B., Durand S., Marchand P., Le Bizec B., Piroux M., Puyo S., Thorin C., Delbac F, Pouliquen H. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*. 86 : 98-104.
- Lamers P.P.**, Janssen M., De Vos, R.C.H., Bino R.J., Wijffels R.H. 2012. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*. 162: 21-27.
- Lee Y.K.** 2001. Microalgal mass culture systems et methods: Their limitation et potential. *Journal of Applied Phycology*. 13 : 307-315.
- Lefranc M.**, Thénot A., Lepère C., Debroas D. 2005. Genetic Diversity of small eukaryotes in Lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 : 5935-5942.
- Li G.**, Chen S., Wang Y., Xue Y., Chang Y., Li Z., Wang J., Xue C. 2011. A novel glycosaminoglycan-like polysaccharide from abalone *Haliotis discus hannai* Ino: Purification, structure identification and anticoagulant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 49(5) : 1160-1166.
- Li Y.**, Han D., Sommerfeld M., Hu Q. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*. 102 : 123-129.
- Li Z.**, Ma X., Li A., Zhang C. 2012. A novel potential source of β -carotene: *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae) and pilot β -carotene production in bubble column and flat panel photobioreactors. *Bioresource Technology*. 117 : 257-263.
- Liao M.L.**, Chiovitti A., Munro S.L.A., Craik D.J., Kraft G.T., Bacic A. 1996. Sulfated galactans from Australian specimens of the red alga *Phacelocarpus peperocarpos* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*. 296 : 237-247.
- Lin Q.**, Gu N., Lin J. 2012a. Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. *Bioresource Technology*. 112 : 242-247.
- Lin I.P.**, Jiang P.L., Chen C.S., Tzen J. T.C. 2012b. A unique caleosin serving as the major integral protein in oil bodies isolated from *Chlorella* sp. cells cultured with limited nitrogen. *Plant Physiology and Biochemistry*. 61 : 80-87.

Références

- Lowry** O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193 : 265-275.
- Luning** K. 1990. Seaweeds. Their environment, biogeography and ecophysiology. Wiley Interscience (Eds). 1-742.
- Mallick** N., Mohn F.H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*. 157(2) : 183-193.
- Manrique**, G. D. Lajolo, F.M. 2002. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 25 : 99-107.
- Marcotte** L., Kegelaer G., Sandt C., Barbeau J., Lafleur M. 2007. An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. *Analytical Biochemistry*. 361(1) : 7-14.
- Maréchal** Y. 1997. Interaction configurations of H₂O molecules in a protein (Stratum Corneum) by infrared spectrometry. *Journal of Molecular Structure*. 416(1–3) : 133-143.
- Marquardt** J., Rehm A.M. 1995. *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) from red and green light: characterization of photosystem I and determination of in situ fluorescence spectra of the photosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*. 30(1) : 49-56.
- Martinez Sancho** M.E., Jiménez Castillo J. M., El Yousfi F. 1997. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry*. 32(8) : 657-664.
- Mathias** D.K., Pastrana-Mena R., Ranucci E., Tao D., Ferruti P., Ortega C., Staples G.O., Takashima E., Tsuboi T., Borg N.A., Verotta L., Dinglasan R.R. 2013. A small molecule glycosaminoglycan mimetic blocks *Plasmodium* invasion of the mosquito Midgut. *PLOS Pathogen*. 9: e1003757
- Mayack** C. Naug D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 100 : 185-188.
- McNeill** J., Barrie F.R., Buck W.R., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D.L, Herendeen P.S., Knapp S., Marhold K., Prado J., Prud'homme van reine W.F., Smith G.F, Wiersma J.H., Turland N.J. 2011. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the *Eighteenth International Botanical Congress Melbourne*.

Références

- Meseck S.L.**, Alix J.H., Wikfors G.H. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*. 246(1-4) : 393-404.
- Mihova S.G.**, Georgiev D.I., Minkov K.M. 1996. Phycobiliproteins in *Rhodella reticulata* and photoregulatory effects on their content. *Journal of Biotechnology*. 48(3) : 251-257.
- Millard P.**, Evans L.V. 1982. Sulfate uptake in the unicellular marine red alga *Rhodella maculata*. *Archives of Microbiology*. 131 : 165-169.
- Mitra D.**, van Leeuwen J.(H.), Lamsal B. 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*. 1(1) : 40-48.
- Mizoguchi T.**, Kimura Y., Yoshitomi T., Tamiaki H. 2011. The stereochemistry of chlorophyll-c₃ from the haptophyte *Emiliania huxleyi* : The (132R)-enantiomers of chlorophylls-c are exclusively selected as the photosynthetically active pigments in chromophyte algae. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1807 : 1467-1473.
- Mizuno Y.**, Sato A., Watanabe K., Hirata A., Takeshita T., Ota S., Sato N., Zachleder V., Tsuzuki M., Kawano S. 2013. Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology*. 129 : 150-155.
- Monsigny M.**, Petit C., Roche A.C. 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulphuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry*. 175 : 525-530.
- Monsoor M. A.**, Kalapathy U., Proctor A. 2001. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 74 : 233-238.
- Montreuil J.**, Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G., Stracker G. 1986. Glycoproteins. In : Carbohydrate analysis: a practical approach. Chaplin M.F., Kennedy J.K. (Eds) United Kingdom, Oxford, Oxford IRL press, 143-204.
- Montreuil J.**, Spik G., Chosson A., Segard E., Scheppler N. 1963. Methods of study of the structure of glycoproteins. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 18 : 529-546.
- Morot-Gaudry J.F.** 1997. Assimilation de l'azote chez les plantes : aspects physiologique, biochimique et moléculaire. *INRA* (Eds). 1-422.

Références

- Mörschel** E., Koller K. P., Wehrmeyer W. 1980. Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*, Electron microscopical and biochemical analysis of C-phycocyanin and allophycocyanin aggregates. *Archives of Microbiology*. 125 : 43-51.
- Nitschke** U., Boedecker C., Karsten U., Hepperle D., Eggert A. 2011. Does the lack of mannitol accumulation in an isolate of *Rhodella maculata* (Rhodellophyceae, Rhodophyta) from the brackish Baltic Sea indicate a stressed population at the distribution limit ? *European Journal of Phycology*. 45(4) : 436-449.
- Nosálová** G., Capek P., Matáková T., Nosál S, Flešková D., Jureček L. 2012. Antitussive activity of an extracellular *Rhodella grisea* proteoglycan on the mechanically induced cough reflex. *Carbohydrate Polymers*. 87(1) : 752-756.
- Nuutila** A.M., Aura A.M., Kiesvaara M., Kauppinen V. 1997. The effect of salinity, nitrate concentration, pH and temperature on eicosapentaenoic acid (EPA) production by the red unicellular alga *Porphyridium purpureum*. *Journal of Biotechnology*. 55(1) : 55-63.
- Oh** S.H., Han J.G., Kim Y., Ha J.H., Kim S.S., Jeong M.H., Jeong H.S., Kim N.Y., Cho J.S., Yoon W.B., Lee S.Y., Kang do H., Lee H.Y. 2009. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108(5) : 29-434.
- Paasche** E., Throndsen J. 1970. *Rhodella maculata* Evans (Rhodophyceae, Porphyridiales) isolated from the plankton of the Oslo Fjord. *Nytt Magasin for Botanikk*. 17 : 209-212.
- Patel** A.K., Laroche C., Marcati A., Ursu A.V., Jubeau S., Marchal L., Petit E., Djelveh G., Michaud P. 2013. Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresource Technology*. 145 : 345-350.
- Peña** M.J., Tuomivaara S.T., Urbanowicz B.R., O'Neill M.A., York W.S. 2012. Methods for structural characterization of the products of cellulose- and xyloglucan-hydrolyzing enzymes. *Methods in Enzymology*. 510 : 121-39.
- Perez-Garcia** O., Escalante F.M.E., de-Bashan L.E., Bashan Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45 : 11-36.
- Phillips** L.G., Cowan A.K., Rose P.D., Logie M.R.R. 1995. Operation of the Xanthophyll Cycle in Non-Stressed and Stressed Cells of *Dunaliella salina* Teod. in Response to Diurnal

Références

Changes in Incident Irradiation: A Correlation with Intracellular β -Carotene Content. *Journal of Plant Physiology*. 146(4) : 547-553.

Pignolet O., Jubeau S., Vaca-Garcia C., Michaud P. 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 40(8) : 781-96.

Prescott L.M., Harley J.P, Klein D.A. 2003. Microbiologie (2è édition française). De Boeck (Eds). 1-1137.

Pruvost J., Cornet J.F. 2012. Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors, *In* : Microalgal Biotechnology vol.1 “Potential and Production”. Posten C. and Walter C. (Eds.), Walter De Gruyter GmbH & Co. (Eds) KG. Chapter 10 : 181-224.

Rahaoui A. 1999. Thèse : Écophysiologie de *Rhodella violacea* (Rhodophyta) : production et propriétés structurales des exopolysaccharides et de l'amidon floridéen. Université des Sciences et Technologies de Lille. 1-130.

Raveendran S., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. 2013. Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*. In press.

Reboloso Fuentes M.M., Acién Fernández G.G., Sánchez Pérez J.A., Guil Guerrero J.L. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*. 70(3) : 345-353.

Reybroeck W., Daeseleire E., De Brabander H.F., Herman L. 2012. Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology*. 158 : 1-11.

Rise M., Cohen E., Vishkautsan M., Cojocaru M., Gottlieb H.E., Arad S. 1994. Accumulation of Secondary Carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Plant Physiology*. 144 (3) : 287-292.

Ritz M., Thomas J.C., Spilar A., Etienne A.L. 2000. Kinetics of photoacclimatation in response to a shift to high light irradiance of the red algae *Rhodella violaceae* adapted to low irradiance. *Plant Physiology*. 123 : 1415-1425.

Riyahi J., Haouazine Y., Akallal R., Mouradi A., Creach A., Givernaud T., Mouradi A. 2007. Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en β -

Références

carotène de *Dunaliella salina*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 146 : 235-250.

Roels J.A. 1983. Energetics and kinetics in Biotechnology. Elsevier Biomedical Press (Eds.), Amsterdam. 1-330.

Scagel R.F., Gabrielson P.W., Garbary D.J., Golden L., Hawkes M.W., Lindstrom S.C., Oliveira J.C., Widdowson T.B. 1989. A synopsis of the benthic marine algae of British Columbia, southeast Alaska, Washington and Oregon. *Phycological Contributions, University of British Columbia*. 1-532.

Scott J., Yang E.C., West J.A., Yokoyama A., Kim H.J., Loideaux de Goër S., O'Kelly C.J., Orlova E., Kim S.Y., Park J.K., Yoon H.S. 2011. On the genus *Rhodella*, the emended orders Dixonellales and Rhodellales with a new order Glaucosphaerales (Rhodellophyceae, Rhodophyta). *Algae*. 26(4) : 277-288.

Scott J.L., Yokoyama A., Billard C., Fresnel J., Hara Y., West K.A., West J.A. 2008. *Neorhodella cynaea*, a new genus in the Rhodellophyceae (Rhodophyta). *Phycologia* 47(6) : 560-572. *Corrigendum* : Correction to paper by Scott J.L., Yokoyama A., Billard C., Fresnel J., Hara Y., West K.A., West J.A. 2009. *Phycologia*. 48(2) : 136.

Scott, J.L., Broadwater, S.T., Saunders, B.D., Thomas, J.P. 1992. Ultrastructure of vegetative organization and cell division in the unicellular red alga *Dixonella grisea* gen. nov. (Rhodophyta) and a consideration of the genus *Rhodella*. *Journal of Phycology*. 28 : 649-660.

Shimonaga T., Konishi M., Oyama Y., Fujiwara S., Satoh A., Fujita N., Colleoni C., Buléon A., Putaux J.L., Ball S.G., Yokoyama A., Hara Y., Nakamura Y., Tsuzuki M. 2008. Variation in storage alpha-glucans of the Porphyridiales (Rhodophyta). *Plant and Cell Physiology*. 49(1) : 103-16.

Silva P.C., Moe R.L. 1997. Taxonomic classification of algae. In Seaweed ecology and phycology. Lobban C.S. and Harrison P.J. (Eds). Cambridge University press, UK. 301-308.

Singh S., Arad S.M., Richmond A., 2000. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors. *Journal of Applied Phycology*. 12: 269-275.

Smart M.D., Sheppard W.S. 2012. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 109 : 148-151.

Références

- Stick** RV, Williams S. 2010. Carbohydrates: The essential molecules of life. Oxford, Elsevier Science (Eds), 496p.
- Sun** L., Wang C., Shi Q., Ma C. 2009. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 45(1) : 42-7.
- Sun** L., Wang L., Zhou Y. 2012. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*. 87(2) : 1206-1210.
- Sun** X., Meng X., Xu Z., Song R. 2010a. Expression of the 26S proteasome subunit RPN10 is up regulated by salt stress in *Dunaliella viridis*. *Journal of Plant Physiology*. . 167(12) : 1003-1008.
- Sun** Z., Peng X., Liu J., Fan W.K., Wang M., Chen F. 2010b. Inhibitory effects of microalgal extracts on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs). *Food Chemistry*. 120(1): 261-267.
- Sung** K.D., Lee J.S., Shin C.S., Park S.C. 1999a. Isolation of a new highly co-tolerant fresh water microalga *Chlorella* sp. KR-1. *Renewable Energy*. 16 : 1019-1022.
- Sung** K.D., Lee J.S., Shin C.S., Park S.C., Choi M.J. 1999b. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresource Technology*. 68(3) : 269-273.
- Tamura**, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, D., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution*. 28 : 2731-2739.
- Tannin-Spitz** T., Bergman M., van-Moppes D., Grossman S., Arad S. 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*. 17(3) : 215-222.
- Taylor** K.R., Gallo R.L. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *The FASEB Journal*. 20: 9-22.
- Thepenier** C., Gudin C. 1985. Studies on optimal conditions for polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *MIRCEN Journal*. 1 : 257-268.

Références

- Timel** T.E., Enterman W., Spencer F., Soltes E. J. 1965. The acid hydrolysis of glycosides. II. Effect of substituents at C-5. *Canadian Journal of Chemistry*. 43 : 2296-2305.
- Toncheva-Panova** T.G., Ivanova, J.G. 2002. Interactions between the red alga *Rhodella reticulata* (Rhodophyta) and contaminated bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 497-504.
- Tousignant** M.E. Delorme M. 2006. Connaître le fonctionnement de la plante pour mieux gérer son environnement. *Québec Vert*.
- Traver** B.E., Fell R.D. 2011. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 107 : 43-49.
- Traver** B.E., Fell R.D. 2012. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110 : 408-410.
- Turner** M.F. 1970. A note on nutrition of *Rhodella*. *British Phycological Journal*. 5(1) : 15-18.
- Urbani** R., Sist P., Pletikapić G., Mišić Radić T., Svetličić V., Žutić V. 2012. Diatom Polysaccharides: Extracellular Production, Isolation and Molecular Characterization. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "The Complex World of Polysaccharides"*. Karunaratne D.N. (Ed.). InTech publisher. Chapter 12 : 345-367.
- VanEngelsdorp** D., Meixner M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103 : S80-S95.
- Vidyashankar** S., Deviprasad K., Chauhan V.S., Ravishankar G.A., Sarada R. 2013. Selection and evaluation of CO₂ tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. *Bioresource Technology*. 144 : 28-37.
- Voet** D., Voet J.G. 2005. Biochimie 2^e edition. De Boeck (Eds). 1-1583.
- Wahidin** S., Idris A., Shaleh S.R.M. 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*. 129 : 7-11.
- Wan** C., Bai F.W., Zhao X.Q. 2013. Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01. *Biochemical Engineering Journal*. In press.

Références

- Wang L.**, Li Y., Sommerfeld M., Hu Q. 2013. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology*. 129 : 289-295.
- Wehrmeyer W.** 1971. Electron microscopic study on the fine structure of *Porphyridium violaceum* Kornmann with remarks on its taxonomic position. *Archiv für Mikrobiologie*. 75 : 121-139.
- West J.A.**, McBride D.L. 1999. Long term and diurnal carpo spore discharge patterns in the Ceramiaceae, Rhodomelaceae and Delesseriaceae (Rhodophyta). *Hydrobiologia*. 398-399 : 101-114.
- Wiethaus J.**, Busch A.W.U., Dammeyer T., Frankenberg-Dinkel T. 2010. Phycobiliproteins in *Prochlorococcus marinus* : Biosynthesis of pigments and their assembly into proteins. *European Journal of Cell Biology*. 89 : 1005-1010.
- Williams G.R.**, Sampson M.A., Shutler D., Rogers R.E.L. 2008. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 99 : 342-344.
- Wu M.**, Xu S., Zhao J., Kang H., Ding H. 2010. Preparation and characterization of molecular weight fractions of glycosaminoglycan from sea cucumber *Thelenata ananas* using free radical depolymerization. *Carbohydrate Research*. 345(5) : 649-655.
- Wua Z.**, Zhu Y., Huang W., Zhang C., Li T., Zhang Y., Li A. 2012. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology*. 110 : 496-502.
- Xin L.**, Hong-ying H., Yu-ping Z. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*. 102(3) : 3098-3102.
- Xu X-Q.**, Beardall J., Hallam N.D. 1998. Modification of fatty acid composition in halophilic antarctic microalgae. *Phytochemistry*. 49(5) : 1249-1252.
- Yang Y.**, Gao K. 2003. Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 15 : 379-389.

Références

- Yao C.**, Ai J., Cao X., Xue S., Zhang W. 2012. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology*. 118 : 438-444.
- Yim J.H.**, Kim S.J., Ahn S.H., Kum Lee H. 2003. Optimal conditions for the production of sulfated polysaccharide by marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Biomolecular Engineering*. 20 : 273-280.
- Yokoyama A.**, Sato K., Hara Y. 2004. The generic delimitation of *Rhodella* (Porphyridiales, Rhodophyta) with emphasis on ultrastructure and molecular phylogeny. *Hydrobiologia*. 512 : 177-183.
- Yoon H.S.**, Muller K.M., Sheath R.G., Ott F.D., Bhattacharya D. 2006. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 42 : 482-492.
- Yoshida T.** 1998. Marine algae of Japan. Uchida Rokakuho Publishing Co., Ltd. 1-1222.
- You T.**, Barnett S.M. 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*. 19 : 251-258.
- Yue L.**, Chen W. 2005. Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae *Energy Conversion and Management*. 46(11–12) : 1868-1876.
- Zimm B.** 1948. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *Journal of Chemical Physics*. 1(6) : 1093-1099.

Références internet

- [1] **Guiry M.D.**, Guiry G.M. 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Consulté le 10.06.2013.
- [2] **Société chimique de France**. Chlorophylles. <http://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/chlorophylles.html>. Consulté le 14.10.13.
- [3] **Koning R.E.** 1994. Calvin Cycle. *Plant Physiology Information Website*. http://plantphys.info/plant_physiology/calvincycle.shtml. Consulté le 14-10-2013.
- [4] **Generalic E.** 2013. Starch. *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary*. <http://glossary.periodni.com/glossary.php?en=starch>. Consulté le 14.10.2013.
- [5] **White L.** *Fibrillanosema* spore. Wikimedia Commons. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fibrillanosema_spore.jpg?uselang=fr. Consulté le 14.10.2013.
- [6] **Tourneret E.** Le peuple des abeilles. Eric Tourneret. Photographe. <http://www.thehoneygatherers.com>. Consulté le 14.10.13.
- [7] **Suchail G.S.**, Belzunces L.P. Vaissière B.E. Copyright © 1995-2009. Toxicité subchronique de l'imidaclopride et de ses métabolites chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. *Beekeeping*. http://www.beekeeping.com/abeille-defrance/articles/toxicite_subchronique.htm. Consulté le 14.10.13.

Production scientifique

Articles dans des revues à comité de lecture

VILLAY A., LAKKIS DE FILIPPIS F., PICTON L., LECERF D., VIAL C., MICHAUD P. (2012). Comparison of polysaccharide degradations by dynamic high-pressure Homogenization. *Food hydrocolloids*. 27 : 278-286.

VILLAY A., LAROCHE C., RORIZ D., EL ALAOUH H., DELBAC F., MICHAUD P. (2013). Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. *Bioresource Technology*. 146 : 732-735.

Brevet

DELBAC F., MICHAUD P. EL ALAOUH H., LAROCHE C., DIOGON M., **VILLAY A.** Composition de polysaccharides sulfatés. Brevet Français n°FR1260941. Déposé le 16/11/2012

Communications orales

VILLAY A., LAROCHE C., CORNET J-F., EL ALAOUH H., DELBAC F., MICHAUD P. Polysaccharide production in photobioreactor by *Rhodella violacea*. *Algal Biomass Biofuel Bioproducts*. Toronto juin 2013.

Communications par affiches

VILLAY A., LAROCHE C., CORNET J-F., MICHAUD P. Optimisation de la culture d'une microalgue rouge *Rhodella violacea*. *Groupe Français des Glucides, Domaine du Valjoly*, 21-25 mai 2012.

VILLAY A., LAROCHE C., CORNET J-F., EL ALAOUH H., DELBAC F., MICHAUD P. Optimisation of *Rhodella violacea* culture for exopolysaccharide production. *10th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Prague*, 21-24 avril 2013.

Résumé

Les microalgues rouges de l'espèce *Rhodella violacea* produisent un exopolysaccharide soluble dans le milieu de culture. Au cours de ce travail, les conditions optimales de production ont été déterminées en étudiant l'activité photosynthétique et le milieu de culture des microalgues. La croissance cellulaire et la production d'EPS de *R. violacea* sont optimales avec un milieu de culture f/2 modifié, supplémenté en azote et en phosphore. L'irradiance optimale est de 420 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sous une température de 24°C avec un pH de 8,3. La culture de la microalgue en photobioréacteur de 5 L a permis la production optimale de 0,5 g.L^{-1} de polymère. Le polysaccharide produit est un protéoglycane de type xylane sulfaté et de haute masse molaire ($1,2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$), contenant également du rhamnose, du glucose, de l'arabinose, du galactose et de l'acide glucuronique. L'effet antiparasitaire des polymères de microalgues et de macroalgues a été testé sur des microsporidies, *in vitro* avec des fibroblastes de prépuce humain infestés par *Encephalitozoon cuniculi* et *in vivo* contre la nosérose des abeilles causée par *Nosema ceranae*. L'exopolymère de *R. violacea* empêche la croissance des microsporidies *in vitro* et *in vivo*, et conduit à une diminution de la mortalité des abeilles. D'autres molécules testées ont également une action antiparasitaire, les EPS de *Porphyridium purpureum* et *marinum*, et des carraghénanes sulfatés permettent également de diminuer la croissance des microsporidies et la mortalité des abeilles.

Mots clefs : *Rhodella violacea*, exopolysaccharide, culture de microalgues, microsporidies, nosérose.

Abstract

Red microalgae from *Rhodella violacea* species product a soluble exopolysaccharide release in the media. In this study, optimal culture conditions for exopolysaccharide production were investigated, following photosynthesis activity and culture conditions. This study allowed us to determinate *R. violacea* optimal media for growth and exopolysaccharide production, which is f/2 media supplemented in nitrogen and phosphorus. Optimal physicochemical parameters are an irradiance of 420 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a temperature of 24°C, and a pH of 8.3. Photobioreactor of 5 L used to cultivate *R. violacea* in optimal conditions, gave 0.5 g.L^{-1} of EPS. Structural analysis of the EPS revealed the production of a proteoglycan, principally composed by xylose, sulfated and with a high molecular mass ($1.2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$). The polymer is complex, as it contains different monosaccharide: rhamnose, galactose, arabinose and glucuronic acid. The antiparasitic effect of polymers from microalgae, and macroalgae were investigated on microsporidia, *in vitro* against *Encephalitozoon cuniculi* using Human foreskin fibroblasts, and *in vivo* against *Nosema ceranae* using bees. Exopolysaccharide from *R. violacea* decreases microsporidia growth *in vivo* and *in vitro*. In addition, *in vivo* the polymer allows decrease in bees mortality. Polysaccharide from others origins also have antiparasitic effet, such as exopolymer from *Porphyridium purpureum* and *marinum*, and sulfated carragheenans which reduce microsporidia growth, and decrease bees' mortality.

Keywords : *Rhodella violacea*, exopolysaccharide, microalgae culture, microsporidia, nosema.